

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу
Поповой Александры Антоновны
«Биологическая активность вторичных метаболитов бактерий – летучих органических соединений и небелковой аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланина»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 - генетика

Диссертация А.А. Поповой посвящена изучению биологических функций вторичных метаболитов бактерий на примере двух групп различных по химической природе молекул: летучих органических соединений (ЛОС) и небелковой аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланина (БМАА). Вторичные метаболиты бактерий, несомненно, играют большую роль в жизнедеятельности, как самих продуцентов, так и организмов, на которые может быть направлено их действие. Однако молекулярные аспекты действия этих молекул пока мало исследованы; поэтому тема диссертации и представленные в ней результаты весьма актуальны. В фундаментальном отношении актуальность работы А.А. Поповой связана с изучением действия летучих органических соединений, выделяемых представителями ризосферных бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia*, на различные таксономические группы организмов. При этом впервые изучали генетические основы устойчивости прокариотической клетки к действию кетонов. Также впервые получена коллекция цианобактериальных мутантов, устойчивых к трем разным кетонам, и впервые идентифицированы четыре гена, определяющие чувствительность клеток цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 к действию кетона 2-нонанона. Другой важный аспект – это изучение характера действия цианобактериального нейротоксина бета-N-метиламин-L-аланина на диазотрофную цианобактерию *Nostoc* sp. PCC 7120. Автором обнаружено регуляторное действие этого токсина на процессы клеточной дифференцировки и азотфиксации и, более того, показано, что бета-N-метиламин-L-аланин изменяет характер экспрессии основных генов, вовлеченных в данные процессы. В целом в работе получены новые и приоритетные научные результаты.

Диссертация А.А. Поповой изложена на 174 страницах, содержит 35 рисунков, 24 таблицы и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и Обсуждение», «Выводы», «Заключение» и «Список литературы», включающий 398 ссылок.

Обзор литературы состоит из четырех частей. В первой приводятся данные о летучих веществах бактерий-антагонистов. Здесь автор рассматривает главные аспекты конкурентной борьбы бактерий-антагонистов в ризосфере, приводит характеристику ЛОС, а также описывает опубликованные примеры действия известных ЛОС на разные группы

организмов. При этом автор уделяет значительное внимание малоизученным аспектам и перспективам биоконтроля заболеваний растений с использованием бактериальных ЛОС. Вторая часть посвящена взаимосвязанным вопросам биологического контроля и Quorum sensing-регуляции экспрессии генов у бактерий, в том числе генов, вовлеченных в продукцию важных вторичных метаболитов. Особое внимание привлекает третья часть обзора, посвященная роли нейротоксичной аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланина в биологических системах. Эта часть обзора, опубликованная автором в соавторстве с научным руководителем в журнале «Биохимия», представляет современный взгляд на синтез, идентификацию и механизмы действия бета-N-метиламин-L-аланина на различные организмы, от бактерий до человека. В четвертой заключительной части рассмотрены механизмы генетической и биохимической регуляции азотного метаболизма и дифференцировки клеток цианобактерий в связи с потенциальным участием в этих процессах бета-N-метиламин-L-аланина. Обзор литературы дает полное представление о современном состоянии проблемы и подчеркивает актуальность собственной работы автора. Как и вся диссертация, данный раздел читается с большим интересом, написан ясным научным языком и удачно иллюстрирован.

Содержание раздела «Материалы и методы» свидетельствует о высоком методическом уровне работы, которая выполнена с применением современных молекулярно-генетических, микробиологических и биохимических методов, а также световой и люминесцентной микроскопии. Использованные методы адекватно и эффективно использованы для решения поставленных в работе задач.

Раздел «Результаты и обсуждение», состоящий из двух глав, разделенных на двадцать основных подглав, представляет большой массив интересных и во многом приоритетных научных данных. Отмечу наиболее значимые, на мой взгляд, результаты.

Значительная часть экспериментальной работы автора посвящена действию бактериальных ЛОС на разные группы организмов – бактерии, грибы, нематоды и дрозофилу. После изучения токсического действия общего пула ЛОС, выделяемых почвенными бактериями, было проведено исследование влияния индивидуальных компонентов общей смеси на тестируемые организмы. В частности, было установлено, что цианобактерия *Synechococcus* sp. PCC 7942 проявляет высокую чувствительность к кетонам. С помощью транспозонного мутагенеза было получено 26 мутантов с повышенной устойчивостью к трем разным кетонам. Молекулярно-генетический анализ 11 из этих мутантов позволил идентифицировать 4 гена, инактивация которых приводит к повышенной устойчивости цианобактерии к 2-нонанону. Последующая направленная инактивация этих четырех генов у штамма дикого типа доказала, что именно они

ответственны за чувствительность клеток к 2-нонанону. Следует отметить, что автором впервые показано участие данных генов, функция только одного из которых известна, в детерминации такой чувствительности.

Принципиально важные результаты получены диссертантом при исследовании функциональной роли бета-N-метиламмин-L-аланина в клетках diaзотрофных цианобактерий с использованием различных методических подходов. С использованием газовой хроматографии было показано, что бета-N-метиламмин-L-аланин подавляет нитрогеназную активность цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120. Применение люминесцентной микроскопии позволило подтвердить факт отсутствия гетероцист в условиях голодания по азоту при добавлении бета-N-метиламмин-L-аланина, а также позволило обнаружить новое явление – образование подобных гетероцистам клеток на среде с азотом при воздействии этой небелковой аминокислоты. Далее было исследовано ее влияние на экспрессию семи ключевых генов, вовлеченных в контроль образования гетероцист и синтез нитрогеназы, а также в азотный метаболизм. В результате были показаны существенные различия в экспрессии этих генов в контроле и при добавлении бета-N-метиламмин-L-аланина в разных физиологических условиях.

Все экспериментальные данные обстоятельно обсуждаются автором в главе «Результаты и обсуждение» и в «Заключении».

Ознакомление с диссертацией вызвало два вопроса.

1) Проверял ли автор перекрестную устойчивость к разным кетонам и к другим типам ЛОС у мутантов *Synechococcus* sp. PCC 7942, устойчивых к 2-нонанону?

2) Какими могут быть, по мнению автора, механизмы устойчивости к ЛОС у продуцирующих эти соединения бактерий?

Имеется небольшое замечание относительно использования сокращений. Например, латинское название цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 встречается в виде трех разных сокращений – *Nostoc* PCC 7120, *N.* PCC 7120 и *N.* 7120, что несколько диссонирует с хорошо выдержанным стилем изложения и оформления работы. Однако это замечание не снижает общее благоприятное впечатление о диссертации.

В целом диссертация А.А. Поповой заслуживает высокой оценки. В ней содержатся оригинальные данные, представляющие большой научный интерес. Достоверность и новизна полученных результатов не вызывают сомнений. Выводы адекватно отражают основные результаты работы. Автореферат диссертации полностью соответствует экспериментальным данным и содержит основные положения диссертации. Результаты работы опубликованы в пяти научных статьях, две из которых напечатаны в международных журналах.

Рецензируемая работа вносит существенный вклад в понимание действия бактериальных ЛОС на клетки живых организмов. Впервые идентифицированы гены, инаktivация которых обуславливает повышение устойчивости цианобактерий к 2-нонанону. С практической точки зрения представленные в диссертации результаты могут быть полезны для разработки препаратов биологической защиты от фитопатогенов. Данные о регуляторной роли бета-N-метиламид-L-аланина несомненно важны для дальнейших фундаментальных исследований молекулярных механизмов регуляции азотного метаболизма у диазотрофных цианобактерий.

Содержащиеся в диссертации сведения и заключения интересны и полезны, как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте, для исследователей, работающих в области генетики и молекулярной генетики микроорганизмов, микробиологии, экологии и биотехнологии. Полученные диссертантом результаты могут быть использованы в высших учебных заведениях при подготовке специалистов в перечисленных областях биологии.

В целом можно заключить, что диссертация А.А. Поповой является научно-квалификационной работой, которая полностью соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и изложенным в части II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года. При этом автор диссертации Попова Александра Антоновна, безусловно, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Международный учебно-научный биотехнологический центр
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
119234 г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
Телефон: +7(495)939 05 07; e-mail: babykin@mail.ru
16.03.2016

Кандидат биологических наук доцент

Бабыкин Михаил Михайлович

Подпись руки к. б. н. доцента М.М. Ф
Директор учебно-научного биотехн
МГУ имени М.В.Ломоносова про'
Проректор

Вржеш