

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Екимовой Галины Александровны «Филогенетическая и биохимическая характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз у представителей рода *Methylobacterium*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология

Аэробные метилотрофные бактерии широко распространены в природе и часто являются симбионтами растений. Метилобактерии используют C_1 -метаболиты растений в качестве источника углерода и энергии. Показано, что метилотрофы могут положительно влиять на рост и развитие растений за счет секреции биологически активных веществ (фитогормонов, витаминов). Кроме C_1 -метаболитов некоторые метилобактерии используют аминокислоты растений, например 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК). Метилобактерии, обладающие ферментом АЦК-дезаминазой, могут способствовать снижению содержания этилена в растениях, а также повышать устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам. Кроме того, имеются данные о существовании у метилобактерий фермента D-цистеиндесульфогидразы, катализирующего деградацию D-цистеина. Возможно, этот фермент участвует в формировании ассоциаций бактерий с растениями, а также с большой вероятностью может защищать растения от фитопатогенов. Актуальность диссертационной работы Г.А. Екимовой состоит в изучении распространения генов, кодирующих АЦК-дезаминазу и D-цистеиндесульфогидразу, у аэробных метилобактерий-фитосимбионтов, а также в исследовании биохимических свойств этих ферментов и механизмов регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции.

Диссертационная работа написана и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям: она изложена на 107 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы,

раздела, включающего описание материалов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов и списка сокращений. Список цитируемой литературы включает 226 наименований. Диссертация хорошо иллюстрирована, содержит 8 таблиц и 38 рисунков.

Во введении Г.А. Екимова обосновала актуальность, научную новизну и практическую значимость данного исследования, четко сформулировала цели и задачи. Обзор литературы имеет непосредственное отношение к теме диссертации, он посвящен современному состоянию исследований в области изучения аэробных метилотрофных бактерий. Обзор литературы состоит из нескольких разделов. В начале обзора рассмотрены особенности влияния аэробных метилотрофов-фитосимбионтов на уровень фитогормонов в колонизированных растениях. Далее обсуждаются особенности окисления и ассимиляции C_1 -соединений у метиловых бактерий. Автором подробно анализируется роль данных микроорганизмов в повышении устойчивости растений к стрессовым факторам, а также механизмы фитосимбиоза. В обзоре подчеркивается, что необходимо изучение роли АЦК-деаминаз и D-цистеиндесульфогидраз, синтезируемых метиловыми бактериями, в повышении устойчивости растений к различным видам стресса. Это позволит провести отбор наиболее перспективных штаммов для использования в биотехнологии. Обзор литературы убеждает в глубоком понимании Г.А. Екимовой как предыстории проблемы, так и современного ее состояния и подтверждает правомерность постановки задач и определения путей их решения. В целом обзор литературы является теоретическим обоснованием для выбора стратегии собственных исследований автора работы.

Материалы и методы изложены четко и подробно описаны. Автором использован широкий спектр современных методов микробиологии, молекулярной биологии и биохимии. Эти методы применены для анализа наличия исследуемых генов *acdS* и *dcyD* в различных штаммах аэробных метиловых бактерий. Г.А. Екимовой использованы методы генетической

инженерии для создания продуцентов рекомбинантных белков, а также мутантов для определения функциональной роли белка AcdR. Применение разных подходов, несомненно, делает результаты работы надежными и достоверными. Статистический анализ проведен корректно. Основные научные положения диссертации и выводы обоснованы и логично вытекают из полученных экспериментальных данных.

Экспериментальная часть диссертации Г.А. Екимовой состоит из нескольких частей. Вначале автором были разработаны наборы вырожденных олигонуклеотидных праймеров к генам *acdS* и *dcyD*. С использованием этих пар праймеров проведен ПЦР-скрининг среди 28 типовых штаммов различных видов рода *Methylobacterium*. Все полученные ПЦР-продукты были секвенированы. Определены штаммы метиловых бактерий, обладающих тем или другим геном. Кроме того, автором проведен анализ *in silico* имеющихся в GenBank геномных последовательностей метиловых бактерий. Из 48 типовых штаммов различных видов рода *Methylobacterium* у 29 найдены и/или секвенированы гены *acdS* и *dcyD*. Из них у 18 штаммов обнаружен ген *acdS*, у 13 – *dcyD*, причем два штамма обладали двумя генами одновременно. Г.А. Екимовой проведен филогенетический анализ аминокислотных последовательностей АЦК-дезаминаз и D-цистеиндисульфогидраз метиловых бактерий. Показано, что распределение генов *acdS* и *dcyD* среди этих бактерий подчиняется определенным филогенетическим закономерностям, поскольку обнаружены две группы видов, содержащих ген *acdS* и одна – ген *dcyD*.

В дальнейших исследованиях Г.А. Екимовой получены продуценты и охарактеризованы рекомбинантные АЦК-дезаминазы из клубенькового симбионта *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и факультативной метилотрофной актинобактерии *Amycolatopsis methanolica* 239. Показаны основные свойства выделенных ферментов, определены их молекулярные

массы, каталитические константы. Оптимумы активности зависели от концентрации субстрата, от использованного буфера и температуры реакции.

Одной из важных частей диссертационной работы являлось исследование регуляции экспрессии гена *acdS*. С этой целью клонирован ген *acdR* *M. radiotolerans* JCM 2831 и получен препарат рекомбинантного белка AcdR. Впервые показано, что этот белок специфически и обратимо в присутствии эффектора 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата связывает фрагмент ДНК, содержащий промоторно-операторный участок гена *acdS* и является активатором транскрипции гена АЦК-дезаминазы. Автором предложена новая модель регуляции транскрипции гена *acdS*. Еще одним доказательством подтверждения участия белка AcdR в регуляции синтеза АЦК-дезаминазы стало получение Г.А. Екимовой делеционных и комплементированных мутантов по генам *acdS* и *acdR*. Активность АЦК-дезаминазы у нокаут-мутантов отсутствовала, а комплементация мутации приводила к восстановлению функции фермента. Кроме того, функция AcdR как активатора транскрипции гена *acdS* показана в гетерологичной системе на основе *E. coli*.

Следует отметить, что диссертация хорошо оформлена, имеет большое количество иллюстративного материала, написана четким, понятным языком. Замечаний по диссертации практически нет. Есть небольшое количество опечаток, погрешности в стиле изложения, некоторые сокращения отсутствуют в «Списке сокращений» (например, названия антибиотиков, п.н., т.п.н., БСА, кДа, X-gal). Не приведен состав буферов ТЕ, ТВЕ. В разделе «Материалы и методы» не описано, каким образом определяли зависимость активности АЦК-дезаминаз от концентрации АЦК, состава буфера и от температуры. На рисунках электрофорезов ДНК и белков единицы размерности массы (п.н. или кДа) обычно указываются один раз (справа сверху), чтобы не загромождать рисунок. Подпись к рисунку 5.7.5 (стр. 81), на мой взгляд, плохо отображает приведенные данные, приходится

обращаться к тексту. Однако эти замечания носят рекомендательный характер и не умаляют значения полученных результатов.

При прочтении работы возникли вопросы, ответы на которые хотелось бы услышать от автора:

1. Как можно объяснить тот факт, что максимальная активность выделенных автором АЦК-дезаминаз проявляется при повышенной температуре (50-55⁰С)?
2. Исследованные в данной работе ферменты могут иметь значение для стимуляции роста растений и участвовать в защите растений от фитопатогенов. Планируете ли Вы провести соответствующие эксперименты на растениях, колонизированных изученными Вами метилотрофными бактериями?

В целом, диссертационная работа Г.А. Екимовой отличается новизной и научной значимостью полученных данных. Выводы подтверждены большим количеством экспериментов и их достоверность не вызывает сомнений. Материалы диссертации опубликованы в российских и зарубежных журналах из списка ВАК РФ и доложены на нескольких международных и отечественных конференциях. Автореферат полностью и адекватно отражает содержание диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Екимовой Галины Александровны «Филогенетическая и биохимическая характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз у представителей рода *Methylobacterium*» является законченной научно-квалификационной работой, имеющей большое научное и практическое значение для современной микробиологии и биотехнологии. По актуальности темы, новизне, теоретической и практической значимости результатов работа соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке

присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями Постановления Правительства РФ от № 335 от 21.04.2016 г. «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Екимова Галина Александровна, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.02.03 - микробиология.

Старший научный сотрудник
лаборатории биотехнологии растений
Филиала Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290 г. Пущино Московской обл.,
Проспект Науки, д. 6
доктор биологических наук
(03.01.03 – молекулярная биология)
E-mail: ruk@bibch.ru
Тел. 8-4967-33-09-70

Подпись заверяю
начальник отдела кадров

 С.И.Биляр



Е.Б. Рукавцова

Ученый секретарь ФИБХ РАН,

кандидат химических наук


А.Н. Обухов

15 января 2019 г.

