

## ОТЗЫВ

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

**Актуальность темы.** Аэробные метилотрофные бактерии участвуют в метаболизме растений, регулируя их рост и развитие посредством синтеза фитогормонов – ауксинов и цитокининов, гиббереллинов, а также витаминов. Дезаминирование 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК), предшественника этилена, приводит к снижению концентрации последнего в растениях, это повышает устойчивость растений при различных стрессах и способствует их выживаемости. Несмотря на явную роль АЦК-дезаминазы для растительно-микробного симбиоза, этот фермент исследован довольно слабо, а его транскрипционная регуляция для альфапротеобактерий ранее не изучалась. Исследование АЦК-дезаминаз затруднено высоким сходством их аминокислотных последовательностей с ферментом катаболизма растительной аминокислоты D-цистеина – D-цистеиндесульфогидазой, которая тоже участвует в формировании ассоциации бактерий с растениями. Активность этого фермента приводит к образованию сероводорода, который обладает фунгицидным действием, повышая устойчивость растений к фитопатогенным грибам. В связи с этим, актуальность представленной на защиту диссертационной работы Екимовой Г.А., посвященной изучению распространения генов АЦК-дезаминаз и D-цистеиндесульфогидаз, биохимических свойств и регуляции экспрессии этих генов у аэробных метилотрофных бактерий, не вызывает сомнений.

**Научная новизна результатов.** В данной работе Екимовой Г.А. впервые для альфапротеобактерий показан процесс регуляции гена АЦК-дезаминазы у эпифитной метилотрофной бактерии *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831. Впервые для метилотрофов получены делеционные мутанты *Methylobacterium radiotolerans* по структурному и регуляторному генам АЦК-дезаминазы, а также их комплементированные варианты, проанализирована их способность к деградации АЦК.

Автором проведен детальный анализ распространения генов АЦК-деаминазы и D-цистеиндесульфогидразы среди типовых штаммов видов аэробных метилотрофных бактерий из рода *Methylobacterium* с помощью ПЦР с вырожденными олигонуклеотидными праймерами, а также методом *in silico* в аннотированных геномах. Выявлены филогенетические закономерности, которым подчиняется распределение этих генов у бактерий рода *Methylobacterium*.

**Теоретическая значимость** проведенного исследования заключается, прежде всего, в получении новых данных, которые позволяют углубить знания в области симбиоза аэробных метилотрофных бактерий с растениями.

**Практическая значимость** работы состоит в том, что полученные результаты позволяют полнее реализовать биотехнологический потенциал метилотрофов-фитосимбионтов, разработать на их основе микробиологические препараты, повышающие устойчивость растений к стрессовым воздействиям.

Достоверность и новизна научных положений и выводов диссертационной работы обусловлена четкой логикой ее построения, обоснованностью предлагаемых положений, надежной статистической обработкой данных.

**Анализ содержания диссертации.** Структура диссертации Г.А. Екимовой стандартна для работ подобного рода. Материалы диссертации изложены на 107 страницах и проиллюстрированы 38 рисунками и 8 таблицами. Список цитируемой литературы включает 226 наименований.

В разделе **Обзор литературы** автор освещает современное состояние исследований в области симбиоза бактерий и в частности аэробных метилотрофных бактерий с растениями. Разделы, посвященные бактериальным ферментам катаболизма 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты и D-цистеина, не только охватывают наиболее важные результаты, полученные в последние годы, но и выявляют существующие пробелы в этой области.

**Экспериментальная часть** работы выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов микробиологии, молекулярной биологии и биохимии.

В части **Результаты и обсуждение** описаны проведенные эксперименты и подробно проанализированы полученные данные. Установлено, что 29 из 48

известных видов *Methylobacterium* обладают либо геном *acdS*, либо *dcyD* и, следовательно, могут стимулировать рост и развитие растений за счет активности этих ферментов. Автором проведен филогенетический анализ белков AcdS и гена 16S рРНК на основе которого высказано предположение, что, как минимум, две группы представителей рода *Methylobacterium* разделились и унаследовали от общего предка ген АЦК-деаминазы. Наличие генов *acdS* у двух достаточно обширных групп мезофильных бактерий может свидетельствовать об эволюционной адаптации к их тесной ассоциации с растениями.

Екимовой Г.А. были очищены и охарактеризованы рекомбинантные АЦК-деаминазы из *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и *Amycolatopsis methanolica* 239. Проведен сравнительный анализ их биохимических свойств с ранее изученными ферментами, в результате которого автором высказано предположение о том, что наличие АЦК-деаминазы является одним из адаптационных механизмов ассоциации бактерий с растениями и ее активность обусловлена экологической нишей, занимаемой бактерией. *M. nodulans* является клубеньковым фитосимбионтом, имеющим большой доступ к АЦК, соответственно, имеет наибольшую активность АЦК-деаминазы, тогда как *A. methanolica* – свободноживущая почвенная бактерия, не связанная с поверхностью растений непосредственно, обладает значительно более низкой активностью этого фермента.

В дальнейших экспериментах Екимовой Г.А. очищен и охарактеризован транскрипционный регулятор AcdR гена АЦК-деаминазы *M. radiotolerans*. Установлено, что аминокислотные последовательности белков AcdR мезофильных бактерий кластеризуются совместно с белками альфапротеобактерий и филогенетически значительно отличаются от охарактеризованного AcdR из гаммапротеобактерии *P. putida* UW4. Показано, что белок AcdR из *M. radiotolerans* способен связывать промоторно-операторный участок гена *acdS* в присутствии АЦК, являясь активатором транскрипции данного гена. Екимовой Г.А. предложена модель транскрипционной регуляции гена *acdS*, отличная от изученной ранее у *P. putida* UW4. С помощью делеционных мутантов

по генам *acdR* и *acdS* и в гетерологичной системе на основе *E. coli* автором также продемонстрирована функция белка AcdR как активатора транскрипции гена *acdS*.

В целом, работа Екимовой Г.А. производит исключительно благоприятное впечатление своим поисковым характером, широким спектром задействованных методов, которые включают методы молекулярной микробиологии, а также глубоким интересом автора к объектам исследования. ***За исключением ряда опечаток, существенных замечаний к диссертации нет.***

Высокий методический уровень, новизна полученных в работе фундаментальных данных позволяют рассматривать диссертацию Г.А. Екимовой как целостное и выполненное на современном научном уровне исследование, вносящее значительный вклад в изучение основ симбиоза аэробных метилотрофных бактерий с растениями. Автореферат отражает все основные положения диссертации, а список публикаций автора (3 статьи в рецензируемых журналах и 11 тезисов) свидетельствует о ее зрелости как специалиста.

Диссертация Екимовой Галины Александровны «Филогенетическая и биохимическая характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз и D-цистеиндесульфогидаз у представителей рода *Methylobacterium*» соответствует всем требованиям пп. 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология. Ее автор, Г.А. Екимова, может быть с полным основанием рекомендована к присуждению ей искомой степени.

Профессор кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, доктор биологических наук

Нетрусов Александр Иванович



119234, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1/12

Тел.: (495) 939-54-83, E-mail: [anetrusov@mail.ru](mailto:anetrusov@mail.ru),

Подпись руки д.б.н., проф. А.И. Нетрусова заверяю  
Декан биологического факультета МГУ,

академик

10.01.2019 г.



М.П. Кирпичников