

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Екимовой Галины Александровны на соискание ученой степени кандидата биологических наук.**

Решение диссертационного совета от 06 февраля 2019 г. №2 о присуждении **Екимовой Галины Александровны**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация Екимовой Г.А. «Филогенетическая и биохимическая характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз и D-цистеиндесульфогидаз у представителей рода *Methylobacterium*» по специальности – 03.02.03 – Микробиология принята к защите 07 ноября 2018 г. протокол № 14 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель **Екимова Галина Александровна**, 1989 года рождения, гражданка РФ, в июне 2010 г. окончила ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет» с присвоением степени Бакалавра по направлению «Биология». В 2012 г. окончила магистратуру Пушчинского государственного естественно-научного института. С 2012 по 2018 гг. проходила обучение в очной аспирантуре Пушчинского государственного естественно-научного института. Диссертационную работу соискатель Екимова Г.А. выполняла в лаборатории радиоактивных изотопов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории радиоактивных изотопов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Научный руководитель – Доронина Нина Васильевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФИЦ ПНЦБИ РАН, профессор ПушГЕНИ, г. Пушино.

Официальные оппоненты:

Рукавцова Елена Борисовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Филиал Института Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН);

Нетрусов Александр Иванович, доктор биологических наук, профессор кафедры Микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», дали положительные отзывы.

Ведущая организация: Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН) – в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование, соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а сама автор, Екимова Г.А., заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 «Микробиология».

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии и биотехнологии.

Так, доктор биологических наук Рукавцова Елена Борисовна известна своими исследованиями в области получения трансгенных растений и микроорганизмов. Интересы другого оппонента, доктора биологических наук Нетрусова Александра Ивановича, лежат в области исследований выделения и характеристики новых микроорганизмов различных местообитаний, как аэробных, так и анаэробных. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области микробных биотехнологий, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. *Fedorov D.N., Ekimova G.A., Doronina N.V., Trotsenko Yu.A.* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from *Methylobacterium radiotolerans* and *Methylobacterium nodulans* with higher specificity for ACC // *FEMS Microbiology Letters*. 2013. V. 343. P. 70-76.

2. **Екимова Г.А., Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.** 1-аминоциклопропан-1-карбо-ксилатдезаминаза аэробного факультативно метилотрофного актиномицета *Amycolatopsis methanolica* 239 // Микробиология. 2015. Т. 84. № 4. С. 493-495.
3. **Ekimova G.A., Fedorov D.N., Tani A., Doronina N.V., Trotsenko Y.A.** Distribution of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate deaminase and D-cysteine desulfhydrase genes among type species of the genus *Methylobacterium*. // Antonie van Leeuwenhoek 2018. P. 1-12. DOI: 10.1007/s10482-018-1061-5

Результаты работы также были представлены на 11 международных и российских конференциях: VII Молодежная школа–конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2011); на 15-й, 16-й, 17-й, 18-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI века» (Пушино, 2011, 2012, 2013, 2014); Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2011, 2013» (Тула, 2011, 2013); V Всероссийском медико-биологического конгресса молодых ученых «Заповедник времени» (Тверь, 2012); Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (МГУ, Москва, 2014); IV Пушинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (2017); Biodiversity: Genomics and Evolution (BioGenEvo-2018) Symposium (Новосибирск, 2018).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

#### **На диссертацию поступили следующие отзывы:**

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Рукавцовой Елены Борисовны, (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

«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.

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 (50-55 С)?
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?

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук** Нетрусова Александра Ивановича (положительный). «За исключением ряда опечаток, существенных замечаний к диссертации нет».

-

**Отзыв ведущей организации** Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН) – положительный.

«При изучении текста диссертации возникли вопросы:

1. Чем объяснить тот факт, что Вам не удалось, используя сконструированные праймеры, обнаружить гены АЦК-дезаминаз у исследованных Вами  $\beta$ - и  $\gamma$ -протеобактерий (в отличие от  $\alpha$ -протеобактерий) учитывая, что среди привлеченных к исследованию видов  $\beta$ - и  $\gamma$ -*Proteobacteria* были представители, впервые выделенные из микробо-растительных ассоциаций?
2. Проводился ли поиск гена D-цистеиндесульфогидразы с сконструированными Вами праймерами (кроме  $\alpha$ -протеобактерий) среди представителей других классов *Proteobacteria*?
3. Какое конкретное практическое применение могут иметь результаты Вашего исследования, планируются ли эксперименты по воздействию исследованных штаммов метиловых бактерий на сельскохозяйственные растения?

**На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:**

1. Ст.н.с., к.б.н. сектора актиномицетов отдела Всероссийская коллекция микроорганизмов Пущинского научного центра биологических исследований РАН Барышников Л.М.
2. Доцент кафедры физиологии растений и биотехнологии биологического института Томского государственного университета к.б.н. Франк Ю.А. и зав.кафедрой, д.б.н., профессор ТГУ Карначук О.В.
3. К.х.н., доцент кафедры химии Естественно научного института Тульского государственного университета Кузнецова Т.А.
4. К.б.н., доцент кафедры биотехнологии, зоологии и аквакультуры Астраханского государственного университета Батаева Ю.В.
5. К.б.н., ст.н.сотрудник лаборатории реликтовых микробных сообществ ФИЦ Биотехнологии РАН Деткова Е.Н.
6. К.б.н., ст.н.сотрудник лаборатории биотехнологии растений Филиал Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Захарченко Н.С.
7. К.б.н., ст.н.сотрудник лаборатории физики белка Института белка РАН Марченков В.В.

**Вопросы задавали:** д.б.н. Равин Н.В., к.б.н. Куликов Е.Е. (ФИЦ Биотехнологии РАН), д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Пименов Н.В., д.б.н. Ивановский Р.Н.

**В дискуссии приняли участие:** д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Пименов Н.В.

**Диссертационный совет отмечает, что** диссертация Екимовой Г.А., посвященная исследованию метаболического разнообразия аэробных метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями, идентификации генов и их продуктов, обеспечивающих взаимодействие метилотрофов с растениями, является завершенным научным исследованием. В работе проведен детальный анализ распространения генов АЦК-деаминазы и D-цистеиндесульфогидразы среди типовых штаммов видов аэробных метилотрофных бактерий из рода *Methylobacterium*. 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. Выявлены филогенетические закономерности в распределении генов *acdS* и *dcyD* среди бактерий рода *Methylobacterium*. Очищены и охарактеризованы рекомбинантные АЦК-деаминазы из *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и *Amycolatopsis methanolica* 239. С помощью молекулярно-генетических подходов, а также в результате исследования делеционных мутантов сделаны предположения о транскрипционной регуляции гена АЦК-деаминазы у *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831.

Исследование свойств АЦК-деаминазы, а также регуляции экспрессии этого фермента позволило углубить знания и получить новые данные о механизмах воздействия метилотрофных бактерий на растения.

**Теоретическая значимость работы обоснована тем,** что предложена модель транскрипционной регуляции гена *acdS* *Methylobacterium radiotolerans* отличная от изученных ранее. Впервые для альфапротеобактерий очищен регуляторный белок AcdR из *M. radiotolerans*, относящийся в Lrp-семейству, а также выявлена его роль в регуляции АЦК-деаминазы. Подтверждена гипотеза о том, что AcdR является активатором транскрипции гена АЦК-деаминазы у *M. radiotolerans*.

Сравнительный анализ с ранее изученными ферментами биохимических свойств рекомбинантных АЦК-деаминаз из клубенькового симбионта бобовых растений *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и факультативно метилотрофной актинобактерии *Amycolatopsis methanolica* 239 позволил сделать предположение о том, что наличие АЦК-деаминазы является одним из адаптационных механизмов ассоциации бактерий с растениями и ее активность обусловлена экологической нишей, занимаемой бактерией.

В результате работы получены делеционные мутанты эпифитной метилотрофной бактерии *M. radiotolerans* по структурному (*acdS*) и регуляторному (*acdR*) генам АЦК-деаминазы, а также их комплементированные варианты, способные к сверхсинтезу АЦК-

дезамминазы, проанализирована их способность к деградации АЦК. Показано, что активность АЦК-дезамминазы у нокаут-мутантов отсутствует, тогда как комплементация мутации приводит к восстановлению её функции, а также значительному увеличению активности фермента по сравнению с диким штаммом, независимо от присутствия индуктора.

Проведенная работа является основой для дальнейших исследований организации и регуляции фитосимбиоза у аэробных метиловых бактерий.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработана система вырожденных олигонуклеотидных праймеров для детекции и амплификации генов АЦК-дезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз, которая позволяет в дальнейшем оценить способность бактерий различной таксономической принадлежности к стимуляции роста и развития растений.** Работа расширяет знания о механизмах симбиоза метилотрофов с растениями, данные исследования позволяют реализовать биотехнологический потенциал метилотрофных бактерий, разработать новые биопрепараты-стимуляторы роста и развития растений с заданными свойствами, повышающие продуктивность и увеличивающие устойчивость растений к различным стрессовым воздействиям и фитопатогенам.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила,** что результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов. Диссертационная работа Екимовой Г.А. выполнена с применением комплекса современных микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 3 экспериментальные статьи, 11 тезисов конференций. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

**Личный вклад соискателя состоит в** непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, а также обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по выполненной работе, участии в конференциях.

Диссертация **Екимовой Галины Александровны «Филогенетическая и биохимическая характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз у представителей рода *Methylobacterium*»** представляет собой законченную научно квалификационную работу, внесшую большой вклад в изучение метаболического разнообразия аэробных метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями. Работа соответствует профилю Диссовета Д002.247.02 и требованиям ВАК,

предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с «Положением о порядке присуждения ученых степеней».

На заседании 06 февраля 2019 г. Диссертационный совет принял решение присудить Екимовой Галине Александровне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 чел., из них 15 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени - 15, «против» - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель диссертационного совета Д002.247.02  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
Доктор биологических наук

Н.В. Пименов

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д002.247.02  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
Доктор биологических наук



Т.В. Хижняк

06 февраля 2019 г.