



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

УТВЕРЖДАЮ



Зам. директора ИМБ РАН, д.б.н. проф.

В.Л. Карпов

«28» сентября 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

о диссертационной работе Ксении Михайловны Климиной

«Генетический анализ систем токсин-антитоксин суперсемейства RelBE у лактобацилл»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.02.07 – генетика.

Актуальность исследования.

Бактериальные системы токсин-антитоксин (ТА) представляют собой двухкомпонентные генетические модули, кодирующие белок токсина и белок или РНК антитоксина. При подавлении транскрипции и/или трансляции модуля короткоживущий антитоксин разрушается, более стабильный токсин сохраняется и вызывает гибель клетки. Впервые ТА системы были обнаружены на плаزمиде в 80-х годах прошлого века, в дальнейшем разнообразные ТА системы были идентифицированы в хромосомах практически всех бактерий и многих архей. ТА системы вовлечены в реакцию клетки на стресс, переход в персистирующее состояние, апоптоз. Наиболее важным биологическим значением ТА систем является их участие в совокупности регуляторных процессов бактериальной клетки. Несмотря на неуклонный рост работ, посвященных подобным системам, ТА системы лактобацилл не изучены, и работа К.М. Климиной является первой в этой области. Несомненным является своевременность и актуальность изучения данного явления у

лактобацилл - важнейшей группы молочнокислых бактерий, обнаруживаемых во всех отделах микробиоты человека и широко используемых в пищевой и медицинской промышленности.

Научная новизна работы и практическая ценность результатов.

В работе впервые показано наличие, активность, разнообразие и полиморфизм ТА систем у лактобацилл. Впервые продемонстрирована сложная организация одной из ТА систем – YefM-YoeB *Lactobacillus rhamnosus*, наличие в ней не одного, а четырех сайтов инициации транскрипции. Новым и интересным является демонстрация наличия у лактобацилл (*Lactobacillus helveticus*) новых, ранее не описанных систем ТА. Впервые показано, что ТА системы могут быть использованы в качестве биологических маркеров для характеристики видового и штаммового разнообразия микробиоты человека. Это – как показано в работе - может иметь практическое значение и быть использовано для характеристики отдельных штаммов в микробиоте и состава микробиоты в целом. По данной тематике автором получен патент на изобретение.

Диссертационная работа К.М. Климиной написана традиционно и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, а также выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 190 страницах машинописного текста, включает 27 таблиц, 36 рисунков, 5 приложений. Список цитируемых литературных источников включает 177 наименований.

Во **Введении** диссертационной работы сформулированы цель и задачи исследования, описана актуальность темы, ее новизна и практическая значимость работы.

Глава 1 (Обзор литературы) состоит из шести частей. В данной главе дано общее представление о бактериях рода *Lactobacillus*: классификация, среда обитания, проблемы идентификации и практическое применение лактобацилл. Основная часть обзора литературы посвящена ТА системам. В обзоре процитировано большое количество статей, в том числе последних лет, при этом обзор представляет собой компактный целостный текст, включающий рассмотрение отдельных вопросов биологии ТА систем: структурной организации существующих на данный момент 5 типов ТА систем; механизмов действия и основных мишеней клетки, на которые действуют токсины разных типов ТА систем; функционального значения и практического использования ТА систем. Так как диссертационная работа посвящена ТА системам II типа, то именно им автор в литературном обзоре уделяет основное внимание, описанию их разнообразия и механизмам регуляции их активности.

Глава 2 (Материалы и Методы.) В работе использован большой набор разнообразных современных методов – микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических. Методы описаны подробно и грамотно. Глава свидетельствует о том, что автором проделана большая работа по подбору и освоению различных методов исследования, и что автор в

совершенстве владеет ими.

Глава 3 (Результаты и обсуждения) состоит из семи разделов. Работа была начата с формирования и характеристики коллекции штаммов лактобацилл. Для 62 различных штаммов, выделенных из организма людей, была проведена видовая генетическая идентификация. В результате установлено, что видовая принадлежность нескольких промышленных штаммов не соответствовала паспортным данным. Основная задача работы заключалась в экспериментальном поиске ТА систем в штаммах лактобацилл из лабораторной коллекции и выявлении полиморфизма, а также активности и структурной организации данных систем. Поскольку ТА системы многочисленны и разнообразны, работа была сосредоточена на исследовании систем одного семейства RelBE. Используя нуклеотидные последовательности лактобацилл, депонированные в GenBank, были идентифицированы 9 ТА систем и отдельных генов систем у 3-х видов лактобацилл (*L.rhamnosus*, *L.helveticus*, *L.casei*). Далее с помощью сконструированный системы праймеров эти ТА системы были обнаружены в геномах лабораторных штаммов лактобацилл, и, после клонирования в клетках *E.coli*, было показано, что они действительно проявляют токсическую активность. Обнаруженные ТА системы достаточно стабильны, видоспецифичны, присутствуют практически во всех геномах и отличаются у разных штаммов отдельными нуклеотидными и аминокислотными заменами. Различные штаммы исследованных лактобацилл имеют свой специфический набор генов токсинов и антитоксинов, что позволяет использовать эти системы для характеристики штаммов. Этот факт был подтвержден *in silico* на 11 других видах лактобацилл. Наиболее важным достижением работы являются два факта. Во-первых, изучение строения оперона одной из ТА систем, YefM-YoeB *L.rhamnosus*. Перед опероном был обнаружен т.н. BOX, многократно повторенный в геноме некодирующий фрагмент ДНК величиной около 300пн. В самом опероне были обнаружены 4 сайта инициации транскрипции и новая малая открытая рамка считывания. Во вторых, поиск и обнаружение новых систем токсин-антитоксинов в геноме *L.helveticus*. Результаты работы тщательно документированы таблицами, рисунками, а также Приложением, где скрупулезно приведены все упоминаемые в тексте нуклеотидные последовательности (генов 16S рибосомной РНК и ТА генов), их выравнивания, характеристики полиморфизма ТА систем. Приложение занимает 56 страниц.

К достоинству работы следует отнести тот факт, что часть разделов сделана в сотрудничестве с другими лабораториями (ИОГен РАН, Университета Йены и Института Ханса Кнолля в Германии). Такое сотрудничество лабораторий разного профиля позволило расширить и углубить содержание работы.

Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам в диссертационной работе.

Работа хорошо написана и почти не содержит опечаток.

В качестве замечания можно высказать сожаление, что в работе при большом количестве полученных данных обсуждению результатов уделено меньше места.

Содержание работы полностью отражено в 14 публикациях, в том числе в 6 статьях и 7 тезисах, получен также один патент на изобретение. Результаты проведенных исследований представлены на многих международных и российских конференциях, что доказывает значимость работы. Полученные результаты достоверны, выводы аргументированы.

Таким образом, диссертационная работа Ксении Михайловны Климиной «Генетический анализ систем токсин-антитоксин суперсемейства RelBE у лактобацилл» является полной и законченной. Научное и практическое значение работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Климиной Ксении Михайловны соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре ИМБ РАН (протокол №3 от 21 сентября 2015г.)

С.н.с. лаб. постгеномных исследований
ИМБ РАН, к.б.н.,
по специальности 03.01.03 – молекулярная
биология



Георгий Сергеевич Краснов

111991, Москва, ул. Вавилова д.32

Тел. +7-916-983-6952

gskrasnov@mail.ru