

## ОТЗЫВ

### ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу К.М. Климиной «Генетический анализ систем токсин-антитоксин суперсемейства RelBE у лактобацилл», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности:

03.02.07 – Генетика.

Диссертационная работа К.М. Климиной посвящена исследованию систем токсин-антитоксин у лактобацилл, причём, у тех представителей рода *Lactobacillus*, которые являются симбионтами человека. В связи с этим хочется отметить, что мае этого года исполнилось 170 лет со дня рождения И.И. Мечникова, великого русского ученого, лауреата Нобелевской премии, который явился основоположником учения о симбионтной микрофлоре и ее влиянии на организм человека. Современные методы исследований позволяют по-новому подойти к этой проблеме. В течение последних двух десятилетий наблюдается резкое возрастание интереса к симбионтной микрофлоре человека. Многократно возросло число публикаций, посвященных углублённому изучению отдельных представителей микробиома человека, а также их взаимодействию с организмом хозяина. Результаты исследований последних лет наполнили реальным содержанием высказывание Мечникова: «Многочисленные разнообразные ассоциации микроорганизмов, населяющие пищеварительный тракт человека, в значительной степени определяют духовное и физическое здоровье человека».

Исследованию нормального микробиоценоза и его изменений при болезнях посвящены глобальные национальные и международные проекты. В 2008 г. был запущен глобальный проект «Микробиом человека», цель которого – расшифровка генома бактерий, населяющих человеческий организм. Однако серьёзной проблемой при изучении микробиома является отсутствие эффективных генов-биомаркеров для видовой и штаммовой идентификации бактериальных компонентов. Разработка таких маркеров и технологий для диагностики состава микробиоты человека имеет как научное, так и прикладное значение. Предлагаемое автором использование для этой цели систем токсин-антитоксин (ТА систем), несомненно, является оригинальным и оправданным подходом. Системы токсин-антитоксин системы существуют у бактерий, архей, а также, вероятно, у одноклеточных грибов и, следовательно, присутствовали у общего предшественника всех живых существ. Поскольку у многоклеточных организмов они не обнаружены, это указывает на их важную биологическую роль именно для одноклеточных организмов.

Однако их функции до сих пор представляются во многом загадочными для исследователей. Имеется широкий диапазон предположений, в ряде случаев, подтверждённых экспериментально, – от признания их «эгоистичными» генетическими элементами, до наделения их функциями, обеспечивающими выживание популяции в неблагоприятных условиях за счёт гибели части клеток (так называемая программированная гибель клеток).

Таким образом, диссертационная работа К.М. Климиной лежит в русле современных исследований по данной тематике и вполне актуальна.

В процессе исследований автором решались следующие основные задачи:

1. Создание и характеристика коллекции лактобактерий, выделенных из микробиоты здоровых людей центрального региона России.
2. Анализ *in silico* ТА систем суперсемейства RelBE в секвенированных геномах лактобацилл и изучение полиморфизма и функционирования в клетках *E. coli* ТА систем из штаммов лабораторной коллекции.
3. Изучение регуляции экспрессии ТА системы Yef-YoeB<sub>Lrh</sub> у штаммов *L.rhamnosus*.
4. Поиск и характеристика новых ТА систем у *L.helveticus*.
5. Использование ТА систем в качестве биомаркеров для изучения штаммового разнообразия лактобацилл.

Диссертационная работа К.М. Климиной изложена на 190 страницах машинописного текста, включает 27 таблиц, 36 рисунков. Список цитируемой литературы включает 177 наименований. Диссертация построена по традиционному плану и содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и 5, в совокупности, объёмных приложений, в которых представлены: Последовательность гена 16SRNA штаммов из лабораторной коллекции (Приложение А), Нуклеотидные последовательности межгенного района, предшествующего оперону F0F1 АТФ-синтазы (Приложение Б), Нуклеотидные последовательности ТА систем *Lactobacillus rhamnosus* (Приложение В), Предполагаемые ТА системы в штаммах *L. helveticus* DCP4571, H10 и R0052. Предполагаемые ТА системы в штамме *L. helveticus* DCP4571 (Приложение Г), Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relB\_1* (Приложение Д), а также благодарности.

Обзор литературы посвящён классификации и проблеме идентификации лактобацилл, общей характеристике и классификации ТА систем, разнообразию ТА систем II типа, механизмам действия и биомишениям токсинов ТА систем, установленным

и предполагаемым функциям ТА систем и их практическому использованию. Темы, затронутые в обзоре, непосредственно связаны с задачами диссертационной работы. По мере изложения материала автор отмечает неоднозначные результаты некоторых исследований и не решённые проблемы. Так, рассматривая разнообразные молекулярно-генетические подходы, используемые для идентификации этих микроорганизмов, указывается на отсутствие универсального метода, позволяющего точно определять видовой и штаммовый состав лактобацилл в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) человека. Представляют большой интерес приведенные в обзоре данные о связи ТА систем с общей регуляторной системой бактерий, указывающие на их важную биологическую роль. Обзор написан хорошим языком, читается с интересом. Единственная неточность связана с трактовкой термина «колонизационная резистентность».

В главе "Материалы и методы" излагается широкий спектр микробиологических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов, использованных автором для решения поставленных задач. Он включает работу с бактериями *Lactobacillus*, *E. coli* и *B. subtilis*, выделение ДНК, РНК и электрофорез в агарозном геле, ПЦР-амплификацию, секвенирование ДНК и биоинформатический анализ, обратную транскрипцию и количественную ПЦР в режиме реального времени, определение точки начала транскрипции, создание различных генетических конструкций и плазмид, конструирование транскрипционных фьюзов, в том числе, в составе хромосомы *B. subtilis*. Таким образом, для решения поставленных задач автор применяет самые современные методы исследования.

Полученный К.М. Климиной в процессе решения поставленных задач экспериментальный материал представлен в 7 разделах главы «Результаты и обсуждения». Эти результаты чрезвычайно объёмной и трудоёмкой работы подробно изложены, хорошо документированы и иллюстрированы.

На первом этапе в совместной работе с Д.Х. Кясовой автор провела видовую идентификацию 62 штаммов лактобацилл из лабораторной коллекции, которая включала штаммы, выделенные из организма человека и промышленные штаммы, используемые для производства пробиотиков, БАДов и кисломолочных продуктов. Это осуществлялось с помощью классического подхода – определения нуклеотидной последовательности гена 16S РНК, но для ряда штаммов это удалось сделать только путём определения нуклеотидной последовательности межгенного района, предшествующего оперону F0F1

АТФ-синтазы (Метод разработан Е.У. Полуэктовой и В.Н. Даниленко). Точная видовая характеристика штаммов была важна в данной работе потому, что изученные ТА системы в подавляющем большинстве являются видоспецифичными и, с другой стороны, ТА системы предполагалось использовать в качестве маркеров для изучения видового и штаммового многообразия лактобацилл. Следует отметить, что при этом была переопределена видовая принадлежность ряда производственных штаммов, что имеет важное значение при их дальнейшем использовании, а в перспективе – и для модификации этих штаммов с помощью метаболической инженерии. К сожалению, результат работы, представленной в данном разделе, не отражен в выводах диссертации.

На втором этапе работы был осуществлён биоинформатический поиск ТА систем суперсемейства RelBE типа в секвенированных геномах лактобацилл (по состоянию на 2011 год), причём, в тех видах, которые, как было найдено на предыдущем этапе, преобладали в микробиоте здоровых людей центрального региона России: *L.casei*, *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* и *L.helveticus*. Различные ТА системы были обнаружены только в штаммах *L.rhamnosus*, *L.casei* и *L.helveticus*. Установлена также структура модулей идентифицированных ТА систем суперсемейства RelBE, которая была отнесена к 9 (А – I) типам. По этому разделу следует отметить, что данные таблиц 12 и 13 нуждаются в более подробном пояснении, поскольку в представленном виде они не сразу воспринимаются читателем.

На следующем этапе изучался геномный и генный полиморфизм ТА систем суперсемейства RelBE, обнаруженных в штаммах *L.rhamnosus*, *L.casei* и *L.helveticus*. С этой целью их амплифицировали с помощью ПЦР и секвенировали полученные ПЦР-продукты. Критерием геномного полиморфизма являлось наличие или отсутствие генов в конкретных геномах, критерием генного полиморфизма – изменения в нуклеотидной последовательности генов.

В штаммах *L.rhamnosus* в генах токсина были обнаружены нуклеотидные, а также нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные замены. В одном штамме ген *relE1* содержал IS-элемент, который, как было установлено, принадлежал к IS3 семейству. В связи с таким полиморфизмом предполагается, что не все обнаруженные АТ-системы функционально активны. Различные нуклеотидные, а также нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные замены были обнаружены и при изучении полиморфизма генов ТА-систем в штаммах *L.helveticus* и в штаммах *L.casei*. В процессе этих исследований в некоторых штаммах были найдены одиночные гены токсинов, а также обнаружена необычная система, присутствующая во всех штаммах *L.helveticus*, в которой оба гена аннотируются как антитоксины. Показано также, хотя и на небольшой

выборке, что в штаммах *L.helveticus*, выделенных из ЖКТ содержится большое количество ТА-систем. Это наблюдение соответствует некоторым литературным данным о большом числе АТ систем в некоторых симбионтных штаммах.

Обнаруженная в результате проведенных в этих разделах исследований видо- и штаммо-специфичность ТА-систем суперсемейства RelBE обосновывает вывод автора о том, что распределение ТА-систем может быть использовано для видовой и штаммовой характеристики лактобацилл.

Четвёртый раздел главы «Результаты и обсуждения» посвящен изучению функционирования ТА систем лактобацилл в клетках *E.coli*. С этой целью гены были клонированы в векторы, содержащие ИПТГ-индуцируемый промотор. Полученные гибридные плазмиды переносили с помощью трансформации в клетки *E.coli* BL21(DE3), в которых промотор был активен в присутствии IPTG. При индукции экспрессии генов токсинов в ряде случаев наблюдали в разной степени выраженное подавление роста клеток, что свидетельствовало о синтезе токсинов в клетках *E.coli*. Этот факт подтверждают эксперименты с одновременной экспрессией соответствующего антитоксина, при которой рост восстанавливался. Таким образом, вывод автора о том, что для ряда ТА-систем показана активность как токсинов, так и антитоксинов в клетках *E.coli*, полностью соответствует результатам проведенного исследования.

Следующий раздел главы посвящен изучению регуляции экспрессии ТА системы YefM-YoeB у штаммов *L.rhamnosus*. При анализе нуклеотидной последовательности на участке, предшествующей соответствующему оперону был обнаружен так называемый ВОХ-элемент, который располагается в некодирующих областях в количестве 12-13 копий и присутствует во всех секвенированных геномах *L.rhamnosus*. В опытах по удлинению праймера было обнаружено 2 сайта инициации транскрипции в опероне, что указывает на существование двух промоторов, которые находятся внутри ТА системы. Затем, с помощью дополнительного метода (определения дефицитных мРНК), удалось показать наличие перед опероном основного промотора. Кроме того, этим же методом выявлен ещё один промотор, который находится за опероном и иницирует транскрипцию в противоположном направлении. В дальнейшем изучалась активность предполагаемых промоторов и участка ВОХ. С этой целью конструировались фьюзы соответствующих промоторов с геном-репортёром β-галактозидазы, которые встраивались в геном *B. subtilis*. Оказалось, что активен только основной промотор, причём, его функционирование не зависит от элемента ВОХ. Хотя заключение автора о «сложной структуре» ТА системы YefM-YoeB<sub>Lth</sub> и наличие перед опероном участка ВОХ и соответствует данным

проведенных экспериментов, на наш взгляд, вряд ли стоит выделять его в отдельный вывод диссертационной работы. Сама по себе констатация «сложности» без выяснения её природы и значения не может быть представлена как значимый результат исследования. В действительности же проведенная работа создала предпосылки для последующих экспериментов, связанных с изучением транскрипционной активности генов *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* в стрессовых условиях методом RTq PCR. Это исследование показало, что экспрессия оперона индуцируется при повышении температуры и зависит от фазы роста культуры. Кроме того, она варьирует в зависимости от штамма, из которого была выделена. Поэтому соответствующий пункт выводов полностью обоснован. Здесь следует также заметить, что номера таблиц на стр.104 диссертации указаны неверно.

6-й раздел главы «Результаты и обсуждения» посвящен поиску и характеристике новых ТА систем у *L.helveticus*. Для этого сначала осуществился поиск таких систем в секвенированных геномах этого вида лактобацилл, и после анализа гомологии аминокислотных последовательностей выделили 27 новых предполагаемых ТА систем. Затем определяли наличие этих систем в четырех российских штаммах *L. helveticus*, выделенных из организма человека. В результате в них обнаружили гены 18 (из 27) ТА систем. Было показано, что по наличию или отсутствию генов предполагаемых токсинов ТА систем лабораторные штаммы отличались друг от друга. Далее, изучался генный полиморфизм по данным локусам. Оказалось, что внутри каждой из выявленных и проанализированных систем нуклеотидные последовательности генов у всех 4-х лабораторных штаммов были идентичны или отличались единичными заменами за исключением одной системы, в которой была показана значительная деградация гена токсина. Предполагаемые гены токсинов были клонированы в *E.coli* и изучалась их влияние на рост клеток в условиях индукции с помощью ИПТГ. В результате выявлено 3 гена токсинов, которые при экспрессии подавляли рост клеток. В одном случае удалось показать, что свою активность проявлял в клетках *E. coli* и соответствующий антитоксин. Таким образом, 6 пункт выводов диссертационной работы также полностью обоснован.

Наконец, в 7 разделе главы «Результаты и обсуждения» на основании проведенного биоинформативного анализа распределения генов суперсемейства RelBE в секвенированных геномах бактерий рода *Lactobacillus* показано, что эти гены можно использовать для идентификации видов и штаммов лактобацилл.

В кратком Заключение автор подводит итоги проведенной работы.

Таким образом, Климиной К.М. впервые проведено исследование наличия, разнообразия и полиморфизма систем токсин-антитоксин у лактобацилл, в частности, у штаммов *L.rhamnosus*, *L.casei* и *L.helveticus*. Обнаружены и исследованы новые ТА

системы в штаммах *L.helveticus*. Показана активность ряда ТА систем в клетках *E.coli*. Показано, что ТА системы могут быть использованы в качестве биологических маркеров для характеристики сообществ микроорганизмов, например, в микробиоте человека. Эти результаты представляют значительный теоретический и практический интерес. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, свидетельствующем о том, что К.М. Климина является квалифицированным специалистом в области генетики.

Приведенные при обсуждении работы замечания не влияют на суть диссертационной работы и ее общую положительную оценку. Выводы, сформулированные в диссертационной работе, следуют из этапов проделанной экспериментальной работы и вполне обоснованы. Диссертация грамотно написана и хорошо оформлена. В тексте имеется всего лишь несколько опечаток и орфографических ошибок.

Содержание работы Климиной К.М. отражено в 6 печатных работах, в том числе в 3 статьях в зарубежных научных изданиях и в 3 статьях в российских журналах, которые рекомендованных ВАК Минобрнауки; материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и российских конференциях, опубликованы в сборниках тезисов конференций.

Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Таким образом, представленная диссертационная работа по своей структуре и содержанию в полной мере отвечает требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» №842, утвержденного Правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., а ее автор, – Климина Ксения Михайловна – несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Ведущий научный сотрудник НИИ Аджиномото-Генетика (ЗАО «АГРИ»)

д.б.н., проф.

В.А. Лившиц

5 октября 2015г.

НИИ Аджиномото-генетика (ЗАО «АГРИ»), г. Москва (8)495-780-33-78, доб.414,  
[vitaliy\\_livshits@agri.ru](mailto:vitaliy_livshits@agri.ru)

Подпись В.А. Лившица заверяю

Заместитель Генерального директора НИИ Аджиномото-Генетика

(ЗАО «АГРИ»), к.б.н.



К.В. Рыбак