

ОТЗЫВ
официального оппонента

на диссертационную работу **Обандо Сандовала Тобиаса Амилкара**
«Генетический контроль транспорта сидерофоров у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 – Генетика

Актуальность темы исследования. Цианобактерии относятся к важнейшим первичным продуцентам планеты и обеспечивают около 25% глобальной фиксации CO₂. Из-за необходимости адаптироваться к самым разнообразным условиям окружающей среды цианобактерии образуют широкий спектр различных вторичных метаболитов, обладающих биологической активностью. В том числе, цианобактерии синтезируют сидерофоры – низкомолекулярные химические соединения, специфически связывающие ионы железа. Основная роль сидерофоров заключается в аккумуляции железа из окружающей среды и создании растворимого комплекса, доступного для клеток микроорганизмов. Сидерофоры играют важную роль в микробной экологии, например, в сельском хозяйстве они способствуют стимуляции роста растений, увеличивая доступность железа в растительных клетках. Сами цианобактерии также имеют исключительную потребность в железе для обеспечения фотосинтеза, так как этот микроэлемент входит в состав фотосинтетических систем.

Научная новизна исследования. Новизна исследования заключается в: (1) обнаружении способности цианобактерии *Synechocystis* использовать специфические чужеродные Fe-сидерофоры (ксеносидерофоры) в качестве единственных источников железа через типичный для граммотрицательных бактерий TopB-зависимый путь транспорта; (2) идентификации генов, кодирующих все необходимые компоненты TopB-зависимой системы активного транспорта дигидроксаматных ксеносидерофоров у *Synechocystis*; (3) определении роли AgaC-подобных факторов транскрипции в регуляции экспрессии генов транспортеров сидерофоров у цианобактерий.

Структура и объем работы. Диссертация С.Т.А. Обандо изложена на 116 страницах машинописного текста, построена по общепринятому плану и состоит из оглавления, введения, основной части, включающей главы «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение» и «Выводы», а также списка сокращений, списка литературы и приложения, содержит 21 рисунок и 5 таблиц. Список цитируемой литературы включает 259 публикаций, из которых 258 – на английском языке. Список публикаций по теме диссертации приведен в

автореферате.

«Введение» содержит все требующиеся при оформлении диссертации подразделы. Ясно и лаконично изложена информация, демонстрирующая актуальность и современное состояние темы исследования. Четко сформулированы цель и задачи работы. Приведены данные, свидетельствующие о достоверности всех полученных результатов.

Обзор литературы посвящен генетическому контролю поглощения железа у цианобактерий и содержит три подраздела. Первый подраздел содержит информацию о биологическом значении и доступности железа в природе. Во втором подразделе подробно описан транспорт железа в клетки грамотрицательных бактерий. Завершает обзор литературы рассмотрение регуляторных систем гомеостаза железа у цианобактерий. Обзор литературы написан хорошим языком, читается с интересом и проиллюстрирован понятными и красивыми схемами, позволяющими легко вникнуть в детали процессов связывания железа сидерофорами и транспорта железа внутрь клетки.

В главе «Материалы и методы» детально описаны использованные в работе штаммы, микробиологические методы культивирования и клонирования цианобактерий, генно-инженерные методы работы с рекомбинантными ДНК, получения мутантов, метод количественного анализа экспрессии генов с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Работа дополнена аналитическими методами определения концентраций сидерофоров и спектральным анализом состояния клеток цианобактерий. Все описанные в этой главе методы и экспериментальные подходы были адекватно и эффективно использованы для решения поставленных в работе задач.

Результаты исследования последовательно изложены автором в соответствии с задачами работы. Эта глава диссертации включает три основных раздела: (1) TonB-зависимая утилизация дигидроксаматных ксеносидерофоров у цианобактерии *Synechocystis* (2) Генный кластер *fecCDEB1-schT* является существенным для утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров клетками *Synechocystis* (3) Участие ксеносидерофора SAV и факторов транскрипции семейства AraC/XylS в регуляции экспрессии генов *schT* и *fecB1* *Synechocystis*. Каждый раздел состоит из подразделов. В ходе экспериментальной части диссертации были получены следующие приоритетные результаты. Показана способность одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* в качестве единственного источника железа использовать ксеносидерофоры FeSK и SAV, относящиеся к дигидроксаматному типу сидерофоров и продуцируемые различными видами нитчатой цианобактерии рода *Anabaena*. Установлено, что поглощение и транспорт сидерофоров в цитоплазматическое пространство происходит благодаря белковому комплексу TonB-ExbB1-

и'

ExbD1 и не зависит от трансмембранных транспортеров FutABC и FeoB. Было определено, что для поглощения ксеносидерофоров FeSK и SAV необходимы гены, входящие в кластер *fecCDEB1-schT* и кодирующие TonB-зависимый транспортер SchT и компоненты ABC-транспортеров Fec-типа. Показана регуляторная роль AraC-подобных факторов транскрипции PchR1, PchR2 и PcrR и влияние ксеносидерофора SAV на экспрессию генов *schT* и *fecB1*, продукты которых важны для транспорта SAV внутрь клетки. Полученные данные представлены в виде таблиц, диаграмм, схем, графиков и фотографий.

В следующей главе «Обсуждение» на основании полученных результатов автор предлагает модель пути транспорта дигидроксаматных ксеносидерофоров в клетку *Synechocystis*, обозначает дальнейшие пути развития данной работы, сопоставляет полученные данные с результатами опубликованных ранее работ, освещает экологический аспект способности *Synechocystis* утилизировать ксеносидерофоры.

Следует отметить, хорошее оформление диссертации, качественный иллюстративный материал, работа изложена четким и ясным языком, очень хорошо вычитана, не содержит опечаток, практически отсутствует сленг.

Достоверность и новизна полученных результатов не вызывают сомнений. Выводы адекватно отражают результаты работы, конкретны и подтверждены большим количеством экспериментального материала. Автор аккуратно цитирует все использованные источники информации. Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание. Тема диссертации соответствует заявленной специальности 03.02.07 «Генетика». Результаты работы опубликованы в двух статьях в международных рецензируемых журналах и представлены на нескольких конференциях.

Высокий методический уровень и приоритетность полученных в работе фундаментальных данных дают основание рассматривать диссертацию С.Т.А. Обандо как целостное научное исследование, соответствующее мировому уровню и вносящее значимый вклад в получение знаний о молекулярных механизмах транспорта и утилизации ксеносидерофоров цианобактериями. Важно также отметить, что автором была получена внушительная коллекция мутантов цианобактерии *Synechocystis*, которая может быть использована для последующего изучения механизмов регуляции клеточного гомеостаза железа и TonB-зависимых систем транспорта органических соединений у цианобактерий.

Вопросы и замечания по диссертации:

1. В тексте диссертации при указании использовавшихся антибиотиков после названия в скобках следуют их концентрации – иногда с указанием размерности внутри скобок, иногда без.
2. На стр. 29 использован некорректный термин «небольшие РНК» - имеются ввиду малые РНК.
3. В автореферате отсутствует нумерация разделов в главе «Результаты». Первый раздел **Результатов** в автореферате озаглавлен, как «ТонВ-зависимая утилизация дигидроксаматных ксеносидерофоров у цианобактерии *Synechocystis*». В диссертации он включает подразделы «Конструирование мутантов $\Delta tonB$ и $\Delta exbBD1$ *Synechocystis*», «Инактивация генов кластера *tonB-exbB1D1*», «Тригидроксаматные ксеносидерофоры FCH и FOB», «Дигидроксаматные ксеносидерофоры FeSK и SAV», «Инактивация генов *feoB*, *futB* или *futC*» (названия подразделов указываю сокращенно, полностью они даны в автореферате) и еще один подраздел, не вошедший в автореферат. Таким образом, информация под заголовком «ТонВ-зависимая утилизация дигидроксаматных ксеносидерофоров у цианобактерии *Synechocystis*» в автореферате является вступительной к последующим подразделам, что неочевидно из-за отсутствия иерархической нумерации.

В этом же разделе написано: «В предварительных экспериментах было обнаружено, что Fe-сидерофор FeSK восстанавливает рост штамма WT *Synechocystis* в обедненной железом среде. Это свидетельствовало о способности дигидроксаматного ксеносидерофора в качестве единственного источника железа поддерживать рост клеток и позволяло полагать, что его утилизация зависит от системы TonB-ExbB-ExbD, обеспечивающей транспорт соединений через наружную мембрану энергией внутренней мембраны у грамотрицательных бактерий». Не очень понятно, что именно это свидетельствует о связи с системой транспорта TonB-ExbB-ExbD. Обоснование кратко упомянуто уже в следующем разделе автореферата «Конструирование мутантов $\Delta tonB$ и $\Delta exbBD1$ *Synechocystis*». В диссертации приведены результаты биоинформационного анализа гомологии белков, входящих в транспортный комплекс TBDT исследуемой цианобактерии *Synechocystis* и нитчатой цианобактерии *Anabaena* 7120, продуцирующей сидерофор SK, на основании которых можно предположить, что белковый комплекс TonB-ExbB1-ExbD1 вовлечен в транспорт ксеносидерофоров у

Synechocystis.

4. В главе «Материалы и методы» нет упоминания о методах биоинформационного анализа, использованных в работе.
5. Поясните, почему *A. variabilis* росли в diaзотрофных условиях? Есть ли предположение о связи процессов азотфиксации цианобактериями и синтеза сидерофоров в той или иной степени?

Замечания носят рекомендательный характер, не снижают значения представленных в диссертации результатов и производимое ей общее благоприятное впечатление.

Таким образом, можно заключить, что диссертация Обандо Сандовала Тобиаса Амилкара является научно-квалификационной работой, которая полностью соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и изложенным в части II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года. При этом автор диссертации Обандо Сандовал Тобиас Амилкар безусловно заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Официальный оппонент

старший научный сотрудник лаборатории
метаболизма экстремофильных прокариот,
ФИЦ Биотехнологии РАН,
кандидат биологических наук
(специальность 03.02.07 – Генетика)

Александра Антоновна Попова

4 апреля 2019 г.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ «Биотехнологии» РАН)

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2,

Телефон: +7 967 196 53 12

Эл. адрес: alexandra.a.popova@gmail.com

