

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Ким Деборы «Структура гликополимеров клеточной стенки как хемотаксономический признак актинобактерий рода *Clavibacter*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Актуальность работы. Исследования, связанные с изучением гликополимеров клеточных стенок актинобактерий, были начаты на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ в конце 50-х годов прошлого столетия с обнаружения тейхоевых кислот у *Streptomyces streptomycini*. С тех пор эти биополимеры, ковалентно связанные с пептидогликаном, были выявлены не только у других представителей стрептомицетов, но и у многих грамположительных бактерий, в частности, представителей класса Actinobacteria (изучены представители порядков Actinomycetales, Bifidobacteriales, Kineosporiales, Frankiales, Geodermatophilales). Было показано, что для ряда изученных групп актинобактерий гликополимеры и их структурные компоненты могут быть специфичными для видов или таксонов более высокого ранга и могут дифференцировать виды, в том числе и филогенетически близкие, трудно различимые по общепринятым хемотаксономическим признакам. Начатые в последние годы исследования представителей порядка Micrococcales показали, что бесфосфатные гликополимеры могут служить маркерами, дифференцирующими виды на уровне фенотипа. Такая дифференциация особенно важна для близкородственных видов, трудно различимых по классическим фенотипическим характеристикам, в частности представителей рода *Clavibacter* семейства *Microbacteriaceae*. Особый интерес к этой группе актинобактерий обусловлен тем, что они, будучи ассоциированными с растениями, часто являются фитопатогенами. Гликополимеры клеточных стенок грамположительных бактерий, ассоциированных с высшими организмами, привлекают внимание исследователей в связи с их участием в колонизации и инфицировании организма-хозяина. В связи с вышесказанным **актуальность** проведенных автором исследований не вызывает сомнений и является достойным продолжением и развитием гликобиологического направления в изучении микроорганизмов.

Диссертационная работа Ким Деборы посвящена изучению таксономической значимости бесфосфатных гликополимеров, входящих в состав клеточных стенок представителей рода *Clavibacter*, среди которых встречаются как фитопатогенные, так и эндофитные микроорганизмы, для дальнейшего использования в установлении или уточнении видового статуса изучаемых штаммов и создания более совершенной системы их идентификации.

Сформулированные в работе задачи соответствуют цели исследований, конкретны и логичны в последовательности решений. Удачен выбор **объектов исследования**. Это штаммы пяти валидно описанных видов, являющихся фитопатогенными актинобактериями (*Clavibacter insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *Clavibacter nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, *Clavibacter tessellarius* ВКМ Ас-1406^T и *Clavibacter phaseoli* ВКМ Ас-2641^T), а также эпифитные штаммы, выделенные из растений без признаков заболевания, являющимися претендентами на новый вид (*Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374, *Clavibacter* sp. ВКМ

Ac-2555). Таким образом, особенности структур гликополимеров могут послужить исследованиям, направленных, например, на меры борьбы с фитопатогенами и способы взаимодействия микроорганизм-растение.

Научная новизна не вызывает сомнений и определяется, во-первых, изучением структуры гликополимеров девяти штаммов фитопатогенных и непатогенных видов актинобактерий из рода *Clavibacter*: пяти типовых штаммов (*C. michiganensis* ВКМ Ac- 1403^T, *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ac-1404^T, *C. tessellarius* ВКМ Ac-1406^T и *C. phaseoli* ВКМ Ac-2641^T), и четырех претендентов на новый вид (*Clavibacter* sp. ВКМ Ac-2555, *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1371, *Clavibacter* sp ВКМ Ac-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1374). Во-вторых: установлено, что в состав клеточных стенок всех изучаемых актинобактерий входят по два бесфосфатных гликополимера, среди которых пируватсодержащий галактоманнан. Во всех изученных клеточных стенках выявлены нейтральные полисахариды, интегральная цепь которых состоит из (1→6)-связанных остатков галактофуранозы. Структуры полисахаридов различаются по топологии и моносхаридному составу бокового олигосахаридного остатка, что может служить признаком для разграничения штаммов на видовом уровне. Впервые проведен сравнительный анализ состава и структур гликополимеров клеточных стенок представителей различных видов рода *Clavibacter*. Показано, что полученные результаты хорошо согласуются с генетическими данными и фенотипическими характеристиками этой группы фитопатогенных актинобактерий, что поддерживает реклассификацию каждого из подвидов *C. michiganensis* до видового статуса. Впервые показано, что состав и структурные компоненты гликополимеров (определяемые в кислотных гидролизатах клеточных стенок) могут служить хемотаксономическими маркерами рода и видов *Clavibacter*.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в том, что полученные данные о химическом составе и особенностях строения этих полимеров клеточной поверхности могут служить основой для дальнейших исследований молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клеткой хозяина, разработки методов борьбы с патогенами, в том числе с фитопатогенами класса Actinobacteria. Результаты работы могут быть использованы для создания более полной системы идентификации патогенов растений. Таксономическая специфичность некоторых структурных элементов, может быть успешно применена в повседневной микробиологической практике при идентификации представителей рода *Clavibacter*. Полученные результаты дополняют базу данных Carbohydrate Structure Database (CSDB, веб-портал <http://csdb.glycoscience.ru>) по углеводам прокариот, грибов и растений, что внесёт определённый вклад в гликологию, гликоинформатику, химическую микробиологию и может быть использовано при анализе структур близких биополимеров другими исследователями.

Краткая характеристика основного содержания диссертации.

Диссертационная работа изложена на 126 страницах и состоит из введения, в котором описаны актуальность, новизна и научно-практическая значимость работы и пяти глав: обзора литературы (главы I и II); характеристики объектов и методов исследований (глава III); результатов исследований (глава IV) и их

обсуждения (глава V), а также общего заключения и выводов. Работа содержит 16 таблиц, 50 рисунков. Список цитируемой литературы насчитывает 143 ссылки (из них 129 на английском языке).

В обзоре литературы, состоящем из двух глав, приводится краткая характеристика известных в настоящее время гликополимеров в клеточных стенках грамположительных бактерий, освещена их биологическая роль в микробной клетке. Приведена информация о гликополимерах клеточной стенки как о фенотипическом признаке для уточнения диагноза вида и для идентификации филогенетически близких актинобактерий. Во второй главе этого раздела диссертации подробно изложена информация о представителях рода *Clavibacter*, их морфологии, физиологии и современной классификации, основанной на генетических методах исследования. Приведены сведения об экологии этих организмов, факторах патогенности и мерах борьбы с фитопатогенами.

В главе «Материалы и методы» приведено описание современных подходов исследования, использованных в работе, включающих микробиологические, химические и физико-химические методы, которые были модифицированы диссертантом для решения конкретных задач, что характеризует высокий уровень квалификации соискателя.

В главе «Структуры гликополимеров клеточных стенок изученных представителей рода *Clavibacter*», описан ход экспериментов с применением самых современных физико-химических методов. По каждому изучаемому виду/штамму приведены данные по химическим и ЯМР-спектроскопическим исследованиям, проведён анализ этих данных, сделаны выводы о структуре гликополимеров конкретных организмов.

Методом дифференциального центрифугирования получены клеточные стенки исследуемых актинобактерий, определён их химический состав. Выявлены преобладающие моносахариды (галактоза и манноза) в различных сочетаниях у разных штаммов – рамноза, фукоза, рибоза, глюкозамин. Показано, что в изучаемых клеточных стенках отсутствуют фосфатсодержащие гликополимеры.

Методами холодной и горячей экстракции 10%-ной и 5%-ной трихлоруксусной кислотой выделены препараты гликополимеров и определён их качественный состав с помощью ионообменной хроматографии.

ЯМР-спектроскопические исследования позволили установить структуру полученных гликополимеров. Для индивидуальных гликополимеров были сняты одномерные ЯМР-спектры на ядрах ^{13}C (углерода) и ^1H (протона). Затем, с использованием двумерной гомоядерной $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерной $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC, HMBC ЯМР-спектроскопии эти спектры были расшифрованы. В работе приведены названные спектры для каждого гликополимера, а также последовательное описание и логика расшифровки этих спектров. Удалось показать, что для клеточных стенок всех исследуемых актинобактерий характерно присутствие кислого галактоманнана, замещённого пировиноградной кислотой (в некоторых случаях несущего OAc-группы), что, возможно, является фенотипическим признаком рода *Clavibacter*. Нейтральные гликополимеры – (1→6) связанные галактофурананы с различными боковыми заместителями – имеют индивидуальную уникальную структуру для каждого исследованного штамма и могут являться химическими маркерами видов рода *Clavibacter*. Все структуры были описаны впервые. Полученные данные дополнили базу данных микробных гликополимеров Carbohydrate Structure Database (CSDB, веб-портал <http://csdb.glycoscience.ru>).

В следующей главе «Новые структуры гликополимеров служат хемотаксономическими маркерами видов рода *Clavibacter*», высказаны предположения о возможном применении полученных результатов, в частности, об изучении галактофурананов как небелковых адгезинов, а также высказано предположение, что изучение путей биосинтеза галактофурананов представляет интерес для разработки средств борьбы с фитопатогенными видами *Clavibacter*. Обсуждается таксономический аспект и возможности применения гликополимеров для хемотаксономической характеристики бактерий рода *Clavibacter*. Показано, что представители разных видов изучаемого рода имеют различные профили моносахаридов и гликополимеров клеточных стенок. В целом эти исследования поддерживают гипотезу о таксономическом значении состава и структур, не содержащих фосфатов гликополимеров, клеточных стенок на фенотипическом уровне.

Следует отметить, что в работе для выявления структур гликополимеров использована ЯМР-спектроскопия, что представляется важным новым аналитическим методом для характеристики новых видов в таксономических исследованиях. Этот метод позволяет с высокой точностью обнаруживать различия и особенности структуры гликополимеров, что приводит к разграничению близкородственных актинобактерий, в частности, клавибактерий.

В Заключении подчеркивается, что данная работа выполнена с целью изучения моносахаридного состава и гликополимеров клеточных стенок некоторых представителей рода *Clavibacter* для дальнейшего использования в установлении или уточнении видового статуса штаммов и создания более совершенной системы идентификации фитопатогенов, а также оценки таксономической значимости признака «состав и структура гликополимеров клеточных стенок» для бактерий этого рода.

В результате проделанной работы:

- уточнён моносахаридный состав клеточных стенок изучаемых представителей рода *Clavibacter*. Показано, что кроме Gal и Man (основные моносахариды), а также фукозы и рамнозы, были обнаружены глюкозамин и рибоза;

- установлено шесть новых структур нейтральных гликополимеров, интегральная цепь которых построена из (1→6)-связанных остатков β-D-галактофуранозы, каждый второй остаток которой гликозилирован по второму или третьему гидроксилу ди-, три- или тетрасахаридом различного состава и строения;

- описана структура нового кислого гликополимера – галактоманнана с пируват-кетальными группами на остатках маннозы (в некоторых случаях несущего ещё и О-ацетильные группы);

- показано, что в клеточной стенке каждого исследованного штамма содержится по два гликополимера, а именно: 1) кислый полимер, представляющий собой, пируватсодержащий галактоманнан и 2) нейтральный галактофуранан, имеющий одинаковую основную цепь полимера, построенную из (1→6)-связанных остатков β-D-галактофуранозы состав структуры которых входит галактофураноза – редко обнаруживаемая у бактерий;

- установлено, что все выявленные структуры гликополимеров являются уникальными для *Clavibacter* и найдены впервые у прокариотических организмов;

- пополнена база данных спектров ЯМР для гликополимеров бактериальных клеточных стенок; показана возможность использования ЯМР-

спектров гликополимеров как своеобразных фингерпринтов видов для идентификации новых изолятов исследованного рода.

Все полученные данные представляют практическую ценность: так, помимо таксономического аспекта, изучение галактофурананов как небелковых адгезинов, а также путей их биосинтеза может представлять интерес для разработки средств борьбы с фитопатогенными видами *Clavibacter*. Обнаруженные и описанные новые химические структуры полимеров расширяют представления о многообразии и биосинтетическом потенциале микроорганизмов, а также представляют интерес для будущих исследований в области молекулярной и клеточной биологии, экологии, эволюции микроорганизмов, в частности фитопатогенных и эндофитных представителей рода *Clavibacter*. Полученные результаты будут, несомненно, востребованы при аннотации полных геномов актинобактерий этого рода.

Объем проанализированной литературы, применение современных методов исследования формируют самое благоприятное впечатление о представленной работе. Все, поставленные автором задачи, выполнены в полном объеме, выводы сформулированы на базе большого экспериментального материала, полученного лично автором. Выводы обоснованы и отражают научную значимость и практическую ценность проделанной работы. По результатам работы опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных RSCI, Scopus и WoS; опубликованы тезисы 6-ти докладов на различных симпозиумах и научных форумах: 1-ом и 3-ем Российских микробиологических конгрессах.

В ходе ознакомления с работой возникли некоторые вопросы:

1. Что лежит в основе предположения о том, что пути биосинтеза Galf представляют большой интерес в качестве мишеней для разработки препаратов для борьбы с патогенными организмами, в том числе фитопатогенными видами *Clavibacter*?

2. Почему определять моносахариды и выделять ГП следует из клеточной стенки, а не из целых клеток?

3. С какой целью пришлось уточнять моносахаридный состав клеточных стенок, ведь в предыдущих работах его уже определяли?

Сформулированные вопросы не снижают общей, очень высокой оценки работы. Автореферат отражает содержание диссертации.

По актуальности, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, их научной и практической значимости следует считать, что диссертационная работа Ким Деборы отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова. Содержание работы соответствует специальности 1.5.11. Микробиология по биологическим наукам, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Считаю, что соискатель Ким Дебора

заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (по биологическим наукам).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой биологии почв
факультета почвоведения
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»
Степанов Алексей Львович

Контактные данные:

тел.: +7(495)939-24-58, e-mail: *stepanov*

Специальности, по которым официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.27 - Почвоведение

03.00.07 – Микробиология

Адрес места работы:

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова», факультет почвоведения.
119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, строение 12.
Тел.: +7 (495) 939-29-47; e-mail: soil.msu@mail.ru