

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Ким Деборы на тему: «Структура гликополимеров клеточной стенки как
хемотаксономический признак актинобактерий рода *Clavibacter*» по специальности
1.5.11. – Микробиология

Актуальность темы исследований

Грамположительные коринеформные бактерии наносят существенный экономический ущерб сельскохозяйственным культурам во всем мире. Бактерии характеризуются медленным ростом *in vitro* и *in planta*, многие являются эндофитами, что затрудняет исследование и идентификацию конкретных молекулярных механизмов взаимодействия как патогенных, так и сапрофитных видов с растениями. Диссертационная работа Деборы Ким посвящена актуальной теме и направлена на выявление структурных особенностей гликополимеров клеточной стенки недостаточно исследованных представителей актинобактерий рода *Clavibacter*.

Следует отметить, что компоненты клеточных стенок разнообразны и на настоящий момент изучены для более 600 микроорганизмов класса Actinomycetes. Для гликополимеров грамположительных бактерий, связанных с клеточной стенкой, уже известны многочисленные функции, среди которых структурная, энергетическая, защитная, связанная с формированием ответных реакций на патогены, а также формированием заряда и адгезивных свойств бактериальной поверхности, роль в образовании биопленок, рецепции фагов и прочие. Интерес к этим гликополимерам связан с их значимостью как хемотаксономических маркеров для некоторых родов и видов актинобактерий, среди которых известны представители фитопатогенных грамположительных микроорганизмов, специализированных возбудителей сосудистых заболеваний растений. Изучение структур гликанов, соотношения образующих их сахаров имеет важное значение для понимания существующего структурного разнообразия природных гликополимеров бактерий, их роли в реализации их активности, в адаптации к условиям существования и эффективности патогенеза.

Всё вышесказанное определяет актуальность защищаемой соискателем работы.

Целью настоящего исследования явилось изучение моносахаридного состава и структур гликополимеров клеточных стенок некоторых представителей рода *Clavibacter* и оценка таксономической значимости признака «состав и структура гликополимеров клеточных стенок» для бактерий этого рода. Ранее подобные исследования не проводились. Таким образом, предпринятые Ким Деборой работы являются новыми, актуальными и перспективными как в научно-теоретическом, так и прикладном аспектах.

Научная новизна работы

В ходе реализации цели и решения сформулированных задач автору диссертационной работы удалось получить приоритетные результаты. В частности, с использованием ряда высокотехнологичных химических и физико-химических методов впервые установлены структуры гликополимеров 9 штаммов представителей рода *Clavibacter*, из которых 5 штаммов являются типовыми для своих видов, а 4 штамма претендуют на отнесение к новым видам.

Впервые показано присутствие во всех исследуемых клеточных стенках актинобактерий одновременно двух бесфосфатных гликополимеров (пируватсодержащий галактоманнан и нейтральный 1-6 связанный галактофуранан), которые с учетом проведенного анализа литературных данных имеют хорошую перспективу стать маркерными молекулами для рода и видов *Clavibacter*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные в работе приоритетные сведения имеют высокую значимость, как в теоретическом, так и в практическом плане, так как не только существенно расширяют представления о разнообразии гликополимеров клеточной стенки актинобактерий рода *Clavibacter*, участвующих в коммуникации микроорганизмов с другими живыми организмами в окружающей среде, но и полученные результаты открывают реальные перспективы выяснения молекулярных механизмов эндофитных симбиозов и

патогенеза в растительно-бактериальных взаимодействиях с участием актинобактерий, а также механизмов грамотного влияния на эти процессы. Полученные данные важны для уверенной идентификации патогенов растений на основе наличия и структуры специфичных гликополимеров клеточной стенки.

Результаты проведенных исследований внесут вклад в гликологию, гликоинформатику и химическую микробиологию, так как пополнят базы данных Carbohydrate Structure Database (CSDB, веб-портал <http://csdb.glycoscience.ru> 2024) по углеводам, станут доступны и будут востребованы для сравнительного анализа структур близких биополимеров.

Обоснование положений, выносимых на защиту, их достоверность и новизна. Достоверность выносимых на защиту положений в диссертации Деборы Ким обусловлена большим объемом, детальностью и высоким профессиональным уровнем проведенных исследований с применением микробиологических, физико-химических методов и подходов.

В положениях приведено обобщение приоритетных результатов, полученных в ходе реализации цели исследования. Констатируется тот факт, что пирувилированный галактоманнан и (1→6)-связанный β-D-галактофуранан могут рассматриваться как признак, характерный для представителей рода *Clavibacter*, а для дифференциации штаммов на принадлежность к тому или другому виду внутри рода могут быть использованы особенности строения боковых ди-, три - и тетрасахаридных заместителей в структуре галактофуранана.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Как выводы, так и положения, выносимые на защиту, основаны на большом объеме выполненных исследований с использованием современных методов анализа и высокоточных приборов, с привлечением основных современных технологий структурного анализа гликополимеров.

Исследования актинобактерий соискателем выполнены на базе и под руководством специалистов широко известной в России и за рубежом научной

школы по изучению различных аспектов бактериохимии и гликохимии актиномицетов. Основные результаты исследований опубликованы в авторитетных профильных изданиях. Результаты исследований апробированы в докладах на шести всероссийских профильных симпозиумах.

Содержание и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 126 страницах, включает 16 таблиц, иллюстрирована 50 рисунками. Структура диссертации традиционна и включает введение и V глав (главы I и II - обзор литературы, глава III с описанием объектов и методов исследования, глава IV с изложением полученных результатов и глава V с их обсуждением), а также заключение, выводы, список использованной литературы. Список литературы включает 143 работы, в том числе 129 на английском языке.

Текст автореферата соответствует основному содержанию диссертации.

Во «**ВВЕДЕНИИ**» представлена информация, обосновывающая актуальность темы работы, научную и практическую значимость, определены цель и задачи исследований, охарактеризованы структура, степень апробации и представленности работы в публикациях, сформулированы, положения, выносимые на защиту, а также личный вклад автора и благодарности.

Глава I, включающая 2 раздела и 2 подраздела - обзор литературы, посвященный характеристике компонентов клеточных стенок грамположительных микроорганизмов, как актинобактерий, так и родственных им таксонов. Приводятся данные о принятой классификации типов этих фосфорилированных и бесфосфатных гликополимеров, их разнообразии, обращается внимание на результаты исследований последних лет в этом направлении. Приводятся данные, демонстрирующие функциональную нагрузку этих гликополимеров, важную для таксономии, патогенеза и пр.

Глава II содержит информацию о представителях актинобактерий рода *Clavibacter*, которые в 90-х годах прошлого века были объединены в этот род и включают фитопатогенные коринеформные бактерии, образующие особую группу со структурными особенностями строения пептидогликана. В этой

главе представлен полный всесторонний обзор представителей этого рода, их таксономии, генетических особенностей, патогенеза, данные о факторах вирулентности и даже способах борьбы с вызываемыми этими микроорганизмами патологическими состояниями растений. По каждой главе обзора присутствует краткое обобщение представленного материала. Общий объем обзора литературы 38 страниц.

Глава III посвящена описанию исследованных 9 штаммов рода *Clavibacter*, их источниках, условиях поддержания культур, методов получения биомассы, выделения изучаемых гликополимеров, их разделения с использованием хроматографических методов. Отмечено, что характерные особенности первичной структуры гликополимеров выявляли с помощью ЯМР-спектроскопических исследований. Представлена методология изучения состава и структуры полисахаридов с указанием характеристик используемой приборной базы.

В главе IV представлены результаты исследования сахарного состава изолированных клеточных стенок бактерий, а также результаты ЯМР-спектроскопии – доказательная база, обосновывающая выводы работы и положения, выносимые на защиту. Глава содержит все необходимые графики и материалы, для анализа достоверности полученных данных.

Глава V и «ЗАКЛЮЧЕНИЕ» резюмируют в сравнительном аспекте результаты проведенных исследований с привлечением литературных данных и обосновывают выводы и положения, выносимые на защиту.

Сильные стороны работы

К сильным сторонам работы можно отнести тот факт, что для обоснованного вывода о возможности использования анализа структурных компонентов клеточных стенок актинобактерий на примере рода *Clavibacter* для их таксономии выполнен комплексный анализ сахарного состава, структур гликополимеров клеточной стенки, изолированных различными способами, что важно для полноты охвата возможных вариантов маркерных молекул. По сути, по каждому исследуемому штамму выполнен анализ нескольких гликополимеров. Считаю удачным подбор анализируемых культур, а именно,

изучение как типовых штаммов разных видов рода *Clavibacter*, так и не дифференцированных до вида штаммов, но при этом эндофитных, которые, как правило, селективно связаны с растениями-хозяевами. Наличие среди изучаемых культур фитопатогенов позволило автору получить большой объем материала для анализа и успешной реализации цели исследования.

Замечания и вопросы:

1. Учитывая, что количество повторяющихся звеньев в регулярных полисахаридах может влиять на проявление их биологической активности, а также тот факт, что были проведены процедуры хроматографической очистки препаратов полисахаридов, их электрофорез, имело бы смысл указать молекулярные массы исследуемых полисахаридов, степень полимеризации как важные структурные характеристики полимеров.

2. Считаю, что в методической части следовало бы указать условия проведения диализа (предел исключения диализных мембран) на этапе получения суммарного препарата гликополимеров экстракцией раствором ТХУ, тем самым подчеркнув полноту выделения высокомолекулярных компонентов из клеточной стенки.

3. В работе присутствует небольшое количество опечаток, нарушения принципа размещения и очередности представления иллюстраций и таблиц непосредственно сразу после упоминания.

Заключение

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Деборы Ким «Структура гликополимеров клеточной стенки как хемотаксономический признак актинобактерий рода *Clavibacter*» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации 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.

Таким образом, соискатель Дебора Ким заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология по биологическим наукам.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор,
ФГОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»,
Биологический факультет,
заведующая кафедрой, биохимии и биофизики.

Коннова Светлана Анатольевна

**Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация:** 03.01.04 – Биохимия

Контактные данные

Адрес: 410012, Саратов, ул. Астраханская д. 83
Телефон: +7(917)
E-mail: Konnova

Подпись доктора биологических наук, профессора С.А. Конновой
удостоверяю:
Ученый секретарь Ученого совета СГУ

Семенова В.Г.
20 мая 2024 г.