

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук Кулуева Булата Разяповича на диссертационную работу Берестового Михаила Алексеевича «Дельта-9-ацил-липидная десатураза: локализация и функциональная роль в растительной клетке», представленную в диссертационный совет Д 006.027.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Актуальность исследования

Одним из важнейших механизмов обеспечения устойчивости растений к различным стрессовым воздействиям являются фазовые переходы плазматической мембраны из более твердых состояний в жидкие и наоборот. Это достигается за счет изменений соотношения содержания жирных кислот с одинарной и двойной связью между атомами углерода. Процесс перехода насыщенных жирных кислот в ненасыщенные обозначается термином десатурация, а ферменты катализирующие эти реакции получили название десатураз. Хорошо известно, что при повышении активности десатураз в мембранах увеличивается содержание полиненасыщенных жирных кислот, (ПНЖК) что приводит к флюидизации мембран. Такие фазовые переходы обеспечивают растениям возможность быстрой адаптации к меняющимся условиям среды. К примеру, при действии гипотермии растение испытывает дефицит влаги за счет ригидности мембраны, так как вода оказывается при этом не в состоянии свободно диффундировать. Однако при переходе мембран в более жидкое состояние способность воды диффундировать частично может восстанавливаться. В целом, в биотехнологии растений гены десатураз рассматриваются в качестве важных целевых генов для получения трансгенных растений с повышенной стрессоустойчивостью. Однако генов десатураз очень много и в связи с этим весьма трудоемко и затратно получать для каждого

такого целевого гена трансгенные растения со стабильной экспрессией гетерологичного белка. Диссертация Берестового М.А. посвящена разработке и испытанию системы транзientной экспрессии в модельных растениях табака для изучения функциональной активности десатураз, на примере гетерологичной $\Delta 9$ десатуразы цианобактерии *Synechococcus vulcanus*. Эта система позволяет в короткие сроки и без больших трудозатрат изучать функциональную активность многочисленных генов десатураз.

Активность ферментов десатураз зависит не только от уровня экспрессии, но и от их локализации в клеточных компартментах. В большинстве работ по изучению функциональной роли десатураз исследователи не обращают на это внимание. Напротив, в диссертации Берестового М.А. все эксперименты были направлены на анализ активности $\Delta 9$ десатуразы в зависимости от ее локализации в цитоплазме, в хлоропластах или в ЭПР.

В большинстве исследований посвященных транзientной экспрессии используется лишь один модельный объект, чаще всего *N. benthamiana*. Однако наблюдаемые на одном объекте эффекты в других растениях могут не проявляться или отличаться. Для генной инженерии растений важным является не только повторяемость на одном объекте, но и возможность использования полученных генных конструкций на других видах растений. В диссертации Берестового М.А. в работе использованы два модельных вида - *N. benthamiana* и *N. excelsior*. И на обоих видах доказана активность гетерологичного гена.

Структура диссертационной работы

Диссертация Берестового М.А. изложена на 102 страницах текста, состоит из Введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы исследования», главы «Результаты исследований», главы «Обсуждение результатов исследования», Выводов и Списка литературы. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 13 рисунком. Библиографический указатель (Список литературы) включает 148 источников, большинство из них на иностранном языке.

Во введении Берестовой М.А. дает обоснование актуальности выбранной темы, четко определяет цель работы (Изучение физиологической роли дельта-9-ацил-липидной десатуразы в молекулярном механизме модуляции ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов растений, в зависимости от ее локализации в клетке) и формулирует задачи, необходимые для достижения поставленной цели, приводит положения, выносимые на защиту, дает авторскую оценку научной новизны и теоретической и практической значимости выполненной научно-исследовательской работы. Диссертационная работа характеризуется высоким уровнем личного вклада соискателя во всех проведенных экспериментальных работах. Диссертационная работа прошла апробацию на 4 всероссийских и международных научных конференциях, результаты исследования изложены в 12 публикациях, из которых 3 – статьи в журналах, рекомендованных перечнем ВАК.

В литературном обзоре диссертант подробно освещает современное состояние изучаемой проблемы. Первая часть обзора литературы посвящена подробному рассмотрению классификации десатураз, их структуры, механизма функционирования, локализации. Дается представление о растворимых и мембраносвязанных, а также о дельта и омега десатуразах. Во второй части подробно описываются литературные данные роли десатураз в поддержании гомеостаза клеточных мембран. Отдельно рассматривается биотехнологический потенциал применения десатураз для создания растений, толерантных к абиотическим средам.

Необходимо отметить, что М.А. Берестовой провел весьма значительную аналитическую работу с большим числом отечественных и зарубежных публикаций, в том числе опубликованных за последние 5 лет, которые включены в список цитированной литературы. Обзор литературы непосредственно связан с предметом исследований и в нем достаточно полно отражены современные тенденции исследований растительных десатураз жирных кислот. В целом ознакомление с обзором литературы подводит читателя к существованию ряда нерешенных проблем в рассматриваемой

области, на решение которых и была направлена диссертационная работа М.А. Берестового.

В главе «Материалы и методы исследования» приведены краткая характеристика объектов исследования и описание всех использованных в ходе работы методов. Работа характеризуется использованием современных методов физико-химической биологии. Протоколы методов изложены достаточно подробно для возможного повтора экспериментов другими исследователями. Также в этой главе приводится описание методов статистической обработки полученных экспериментальных данных и компьютерного анализа.

Самая большая глава диссертационной работы посвящена описанию результатов исследования. Первая часть главы 3 посвящена описанию конструирования векторных конструкций. Этот очень важная часть работы, так как от правильности созданных конструкций зависит успешность дальнейших исследований. Автор достаточно подробно описывает создание конструкций и подкрепляет описание хорошим и понятным иллюстративным материалом. Правильность и функциональность созданных векторных конструкций в целом не вызывает сомнений. Далее автор описывает эксперименты по агроинфльтрации двух видов растений рода *Nicotiana*. Важным доказательством успешности агроинфльтрации является детектированное наличие экспрессии репортерного белка GFP, что подкреплено соответствующей фотографией. В дальнейшем автор сосредоточился на доказательстве правильной локализации гетерологичного белка в протопластах. С помощью флуоресцентной микроскопии удалось показать наличие флуоресценции в ожидаемых компартментах клетки. Далее автор не проводил анализ экспрессионной активности гетерологичного гена. Им был проведен анализ активности гетерологичной десатуразы по конечному эффекту, а именно по изменению жирнокислотного состава суммарных липидов. В ходе проведенных анализов удалось убедительно доказать специфичные и ожидаемые изменения в жирнокислотном составе в сторону накопления ПНЖК. Все полученные данные оформлены в виде таблиц, что облегчает

восприятие результатов исследования. Далее приводится анализ полученных результатов, направленных на выявление оптимальной внутриклеточной локализации $\Delta 9$ десатуразы. Для этого автор приводит данные активности $\Delta 9$ десатуразы выраженную как отношение продукт/субстрат реакции десатурации, что позволяет наглядно получить информацию о том, в каком именно компартменте клетки наиболее активен гетерологичный белок.

Обсуждение результатов приводится в отдельной главе 4. Здесь автор обсуждает в основном три важнейших результата исследования: разработка технологии транзientной экспрессии гена $\Delta 9$ десатуразы, зависимость активности $\Delta 9$ десатуразы от внутриклеточной локализации, и использование двух модельных объектов - *N. benthamiana* и *N. excelsior*. Обсуждение подкреплено многочисленными ссылками на литературные данные. Автор здесь также приводит предполагаемую схему функционирования гетерологичных десатураз в различных компартментах растительной клетки.

Выводы сформулированы четко, непосредственно вытекают из полученных данных и не вызывают вопросов. Диссертационная работа Берестового М.А., в целом, написана хорошим научным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки и обсуждены с привлечением литературных данных.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что впервые созданы экспрессионные векторные конструкции, несущие ген *desC* цианобактерии *Synechococcus vulcanus* с регуляторными последовательностями, обеспечивающими локализацию белкового продукта целевого гена в различных компартментах растительной клетки. Разработана система транзientной экспрессии генов, удобная как для оценки сигнальных последовательностей, так и для изучения локализации заданных белков в растительной клетке. Автором получены приоритетные данные о влиянии на жирнокислотный состав экспрессии гетерологичной $\Delta 9$ десатуразы в зависимости от ее локализации и в

зависимости от видовой принадлежности растений, на примере двух видов растений табака - *N. benthamiana* и *N. excelsior*.

Автором предложен новый подход по транзientной экспрессии, включающий преимущества как агроинфильтрации, так и трансфекции протопластов. Данный подход может быть использован при изучении функциональной активности различных генов в системах гетерологичной экспрессии. Полученные в ходе исследований данные могут быть использованы при изучении и других генов десатураз. Созданные в ходе работы генно-инженерные конструкции, и полученные теоретические данные могут быть использованы при создании трансгенных растений с повышенной стрессоустойчивостью и маслом с измененным жирнокислотным составом.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов
диссертационной работы.

Использование для исследований современных методов физико-химической биологии в целом подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в работе М.А. Берестового, а также выносимых на защиту положений и выводов. Во всех исследованиях выборка достаточна, а выбранные методы статистического анализа правильные. Приведенные данные в таблицах и гистограммах позволяют проверить соответствующими методами правильность расчетов, сделанных диссертантом. Необходимо подчеркнуть преимущество использованных в данном исследовании экспрессионных векторов для транзientной экспрессии целевых генов в растениях. Оно заключается во включении в состав векторов дополнительной кассеты экспрессии для гена белка р19 вируса томатов – супрессора посттранскрипционного замолкания генов, контролируемой сильным конститутивным ТСТР промотором. В целом все векторные конструкции сделаны грамотно, что позволило достаточно успешно добиться ожидаемой локализации гетерологичного белка.

Таким образом, полученные Берестовым М.А. научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Следует отметить и то, что

основные результаты диссертации Берестового М.А. опубликованы в рецензируемых журналах и апробированы в научных конференциях. В целом, автореферат соответствует содержанию диссертации.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе.

В ходе чтения к диссертационной работе возникли следующие вопросы:

1. Рисунок 5. Не совсем понятно, почему как ригидность, так и флюидизация мембраны ведут к активации десатураз. В то время как в тексте диссертации написано, что флюидизация ведет к замещению ненасыщенных ЖК на вновь синтезированные насыщенные ЖК.

2. Стр. 35. Приводится информация о том, что при солевом стрессе в клетке накапливаются Na_2 и Cl_2 . Что здесь имелось ввиду? Ведь как натрий, так и хлор в клетке находятся исключительно в ионной форме.

3. Раздел 2.2.1. Какая полимераза использовалась для амплификации целевых генов?

4. Стр. 51. Проводили ли ПЦР-анализ полученных клонов агробактерий. В целом, использовался ли ПЦР-анализ бактерий и растений для проверки наличия целевых генов?

5. Судя по рисунку 5 локализация белка GFP в третьей фотографии может соответствовать хлоропластной локализации, нежели цитоплазматической. Почему было принято решение, что в данном случае наблюдается именно цитоплазматическая локализация?

6. Стр. 66. Секвенированы ли последовательности гомологов гена дельта 9 десатуразы у растений *N. benthamiana* и *N. excelsior*? Проводился ли анализ транскрипционной активности хозяйских генов десатураз после агроинфильтрации?

7. На стр. 70 сообщается, что функциональную активность дельта 9 десатуразы исследовали путем сравнения профилей жирных кислот. На стр. 74 говорится что параметром оценки величины активности $\Delta 9$ десатуразы, является значение отношения продукт/субстрат реакции десатурации. В этой связи могут ли изменения профиля жирных кислот быть отражением

изменений уровня экспрессии в том числе и хозяйских генов десатураз? Какие условия эксперимента и какие результаты доказывают, что наблюдаемые эффекты действительно связаны с активностью гетерологичного гена?

8. Стр. 82. Написано: «По-видимому, $\Delta 9$ ацил-липидная десатураза все же встраивается в мембранные структуры, не связанные с ЭПР и хлоропластами». В какие именно мембранные структуры могла встраиваться цитоплазматическая $\Delta 9$ ацил-липидная десатураза и почему она не могла встроиться в мембраны ЭПР и хлоропластов?

9. В выводах пишется, что наибольшая активность гетерологичной $\Delta 9$ десатуразы у *N. benthamiana* наблюдается в хлоропластах, а у *N. excelsior* в ЭПР. С какими именно особенностями этих двух видов растений это может быть связано?

К диссертационной работе имеется несколько замечаний.

Не совсем понятна целесообразность многочисленных ссылок в самом начале обзора литературы, где описывается основная теоретическая часть, на собственную публикацию, хотя и обзорную. К примеру, на термин транзистентная экспрессия также дается ссылка на собственную публикацию. В работе имеются неудачные выражения, к примеру, «одним из первых клонированных генов десатураз был клонирован ген *FAD2 A. thaliana*». Также в работе имеются ошибки редакционного характера, к примеру, стр. 41. *N. benthamian*, также названия рестриктаз и генов не всегда отмечены курсивом. Имеются несогласованные предложения: к примеру на стр. 54: «получившийся раствор поместили в колбонагреватель, нагревали при температуре 80°C».

Сделанные в Отзыве замечания скорее технического характера и не влияют на актуальность и научно-практическую значимость представленной к защите диссертационной работы.

Диссертация М.А. Берестового представляет завершённую исследовательскую работу и, несомненно, обладает научным и практическим значением. В результате проведенных исследований автором получен ряд

принципиально новых результатов. Эти знания в совокупности с многочисленными литературными данными в будущем позволят подойти ближе к практическому использованию генов десатураз в биотехнологии растений. Диссертация М.А. Берестового является законченной научно-исследовательской работой, в которой содержится решение задачи, имеющей важное значение для биотехнологии растений.

По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертационная работа Берестового М.А. соответствует требованиям пункта 9-14 пп «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а ее автор – Берестовой Михаил Алексеевич – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией геномики растений

Института биохимии и генетики – обособленного структурного

подразделения Федерального государственного бюджетного

научного учреждения Уфимского федерального

исследовательского центра Российской академии наук,

доктор биологических наук

Булат Разяпович Кулуев

11.06.2020 г.

450054, г. Уфа, ул. Проспект Октября, 71,

тел. +7(347) 235-60-88

kuluev@bk.ru

