

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Васиной Дарьи Владимировны на диссертацию Берестового Михаила Алексеевича «Дельта-9-Ацил-липидная десатураза: локализация и функциональная роль в растительной клетке», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа М.А. Берестового посвящена изучению функциональной роли дельта-9-ацил-липидной десатуразы в клетках растений. Десатуразы жирных кислот растений играют важную роль в молекулярных механизмах адаптации растительных клеток к стрессовым состояниям, в том числе, к снижению температуры окружающей среды. Они способны адаптировать липидные структуры клеточных мембран к изменяющимся условиям среды и поддерживать тем самым текущее состояние системы за счет формирования дополнительных двойных связей в жирных кислотах липидного бислоя. Очевидно, что знания о структуре, свойствах и регуляции десатураз жирных кислот представляют важнейшее значение как для фундаментальной науки, так прикладной биотехнологии.

Актуальность темы диссертации

Сегодня в развитых странах мира биотехнологии прочно заняли лидирующее положение практически во всех отраслях хозяйственной деятельности человека. Преимущества биотехнологических процессов очевидны - экологическая безопасность и эффективность. Одним из важнейших направлений промышленной биотехнологии является генетическая инженерия растений, позволяющая добиться повышения сельскохозяйственной ценности растений, устойчивости к патогенам и факторам окружающей среды и декоративных качеств культурных растений.

Оправданным представляется выбор объектов исследований. Десатуразы растений представляют широкую и разнородную группу ферментов, свойства каждого из которых определяются конкретным субстратом. Для многих из них не установлены особенности механизмов действия несмотря на то, что эти ферменты играют определяющую роль в процессах поддержания целостности клеточных мембран и активно участвуют в ответе на стрессовые факторы. Ацил-липидные десатуразы, в том числе, из цианобактерий, достаточно широко изучаются. Существуют данные о их

каталитических и биохимических свойствах. Тем не менее, из проведенного автором анализа литературы становится понятно, что о локализации гетерологичных ЖК-модифицирующих ферментов и связи локализации с их функциональными свойствами известно крайне мало. Характеристики ферментов (и их физиологическая роль) могут значительно варьировать в зависимости от локализации белка. Для выбранного автором объекта исследования - дельта-9-ацил-липидной десатуразы - отсутствуют данные о его локализации в компартментах растительной клетки, также плохо охарактеризованы функциональные особенности фермента. В связи с этим, решение цели и задач, поставленных М.А. Берестовым в своей работе безусловно дополнит данное направление исследований.

Таким образом, актуальность проведения исследования дельта-9-ацил-липидной десатуразы не вызывает сомнений.

1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

На основании осуществленной работы автором сформулировано 7 выводов. Все они соответствуют цели и поставленным задачам, отражают полученные экспериментальные результаты по изучению функциональной роли и локализации $\Delta 9$ -ацил-липидной-десатуразы на примере модельных растений рода *Nicotiana*.

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждена значительным экспериментальным материалом, полученным с использованием современных методов исследований, и не вызывает сомнений.

Диссертационная работа обладает несомненной новизной. В ходе работы показана возможность использования транзientной экспрессии для изучения целевых генов десатураз в модельных растениях. Установлено, что рекомбинантная гетерологичная $\Delta 9$ -ацил-липидная-десатураза проявляет субстратную специфичность как к ЖК 16:0, так и к 18:0. При этом, активность фермента коррелирует с содержанием субстрата (стеариновой кислоты) в том или ином компартменте клетки. Кроме того, предложен механизм функционирования гетерологичных десатураз и их взаимодействия с растительными ферментами в клетке.

Исследование выполнено на высоком методическом уровне с применением разнообразных подходов, соответствующих поставленным задачам и позволяющих получить значимые результаты для характеристики исследуемого фермента. Используемые подходы (процедуры молекулярного клонирования, агроинфильтрация,

флуоресцентная микроскопия и методы масс-спектрометрии) широко применяются в мировой практике, они давно подтвердили свою результативность, что позволяет соотносить данные, полученные М.А. Берестовым с данными других научных групп.

2. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики

Важное **практическое** значение работы определяется проведенной работой по созданию генно-инженерных конструкций для исследования $\Delta 9$ -ацил-липидной-десатуразы, в ходе которой были получены векторы, обеспечивающие точную локализацию белкового продукта целевого гена в хлоропластах, ЭПР и цитоплазме, и разработана система транзientной экспрессии генов, применение которой не ограничивается лишь данной работой, но может быть распространено при исследовании целевых белков в растительной клетке, в частности, для изучения вклада десатураз в модуляцию жирнокислотного состава мембранных липидов растений.

Помимо этого, с использованием полученных данных, в дальнейшем, возможно разрабатывать стратегии и подходы к рациональному дизайну хозяйственно важных растений, устойчивых к стрессовым воздействиям и растений с измененным метаболизмом для получения растительных масел с заданными свойствами, востребованные в промышленности, производстве продуктов питания, фармацевтике и медицине.

Берестовым М.А. получены результаты, имеющие **фундаментальное** значение для понимания особенностей функционирования $\Delta 9$ -ацил-липидной-десатуразы у растений. Показано, что локализация фермента в цитоплазме, хлоропластах и ЭПР приводит к существенному изменению липидного метаболизма у двух видов табака, отличающихся по составу ЖК. При этом, увеличивается доля ЖК 18:1, 18:2 и 18:3, и, как следствие увеличивается индекс ненасыщенности ЖК.

Полученные данные представляют безусловный интерес для широкого круга исследователей и практиков, работающих в различных областях биотехнологии, биохимии, молекулярной биологии.

3. Содержание диссертации

Диссертационная работа М.А. Берестового включает в себя 4 главы, изложена на 102 страницах, иллюстрирована 13 рисунками и содержит 6 информативных таблиц. Разделы диссертации включают: введение, обзор литературы, материалы и методы

исследования, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, выводы, список литературы. При оформлении работы автор придерживался традиционной схемы. Список литературы обширен и включает 148 источников, при этом хорошо освещены работы последнего десятилетия.

Во введении обосновывается актуальность проблемы, формулируются цели и задачи исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость работы, характеризуется личный вклад диссертанта, приводятся результаты апробации полученных данных. Задачи исследования сформулированы четко и обоснованно относительно преследуемой цели. Обзор литературы базируется на анализе большого массива научной информации по тематике работы и в полной мере описывает современное состояние в области изучения свойств и функций десатураз. Досконально описываются современные подходы к классификации ферментов десатураз, разбираются особенности их строения и механизмы их действия. Отдельная глава обзора литературы посвящена анализу имеющихся данных о потенциале применения этих ферментов в современной биотехнологии, что подтверждает обоснованность выбора темы исследования и проведенной экспериментальной работы. Диссертант убедительно доказывает необходимость проводимых исследований. В целом обзор литературы дает подробное представление о предмете исследования и демонстрирует хорошее знание современного состояния дел в области изучения как свойств растительных десатураз, так и их роли в липидном обмене и метаболизме растений, а также предоставляет возможность оценить новизну полученных данных.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны применяемые в работе методики: приведены подробности создания экспрессионных конструкций, подробно описана методика клонирования и также агробактериальной трансформации растений *Nicotiana benthamiana* и *N. excelsior*. Кроме того, приведено описание биохимических методов оценки жирнокислотного состава растительных образцов.

Благодаря логичной постановке экспериментальной части, диссертационная работа представляет собой единое законченное исследование. На первом этапе работы, были сконструированы и получены растительные экспрессионные векторы для изучения локализации и роли рекомбинантной $\Delta 9$ -ацил-липидной-десатуразы в листьях двух модельных растений табака: *N. benthamiana* и *N. excelsior*. Интересно, что данные растения, как далее показал автор, отличаются между собой по составу ЖК, а

также по соотношению C18/C16, поэтому включение в исследование сразу двух видов представляется обоснованным.

Далее была подтверждена локализация соответствующих рекомбинантных конструкций в целевых органеллах растений: цитоплазма, ЭПР, хлоропласты. При этом использовались современные методы визуализации, что не позволяет сомневаться в достоверности полученных результатов.

Заключительная часть работы посвящена характеристике жирнокислотного состава липидов растений, и его сравнительному анализу при различной локализации десатуразы. Методом ГЖХ-МС был проанализирован состав экстрактов листьев трансформированных растений и показано, что локализация белковых продуктов гена десатуразы влияет на липидный метаболизм у двух видов табака, приводя к увеличению уровня ненасыщенности жирных кислот. Эти данные безусловно будут полезны при разработке технологии создания растений устойчивых к стрессовым воздействиям.

Впервые показано, что локализация $\Delta 9$ -ацил-липидной-десатуразы в цитоплазме клеток листовой ткани растений приводит к достоверному изменению состава и массовой доли насыщенных и ненасыщенных жирных кислот суммарных липидов. Показано влияние экспрессии и локализации на липидный метаболизм растений табака.

Важным достижением работы является разработка и применение метода транзientной экспрессии для изучения жирнокислотного состава мембранных липидов и метаболизма растений, в качестве более быстрого и дешевого аналога традиционных методов стабильной экспрессии с интеграцией исследуемых конструкций в геном модели. При этом, автором убедительно доказывается, что сам по себе метод заметно не влияет на жирнокислотный состав растений и подходит для оценки функциональной активности ферментов группы десатураз.

Таким образом, диссертант не только исследует физиологическую роль данного фермента, но и предлагает доступный метод для практического применения для научных целей и биотехнологии.

В ходе прочтения работы и автореферата возникли отдельные вопросы и пожелания:

1. Существуют ли данные о сигнальных последовательностях и клеточной локализации гомолога гетерологично экспрессируемой десатуразы *desC* у *Nicotiniana*? Предпринимались ли попытки оценить активность нативного фермента-гомолога (отношение продукт/субстрат) в интактных растениях или это было сделано лишь для растений с экспрессией eGFP белка?
2. Поскольку $\Delta 9$ ацил-липидная десатураза является мембран-связанным белком, в последовательности должны быть соответствующие трансмембранные домены. Оставались ли эти домены в рекомбинантных конструкциях и, если да, то насколько правомерно говорить о цитоплазматической локализации белка? Подразумевается, что это форма, связанная с цитоплазматической мембраной?
3. Автор утверждает, что в случае *N. benthamiana* наибольшая активность гетерологичной $\Delta 9$ десатуразы наблюдается в хлоропластах (рис 11). Однако, на рисунке приведены достоверные отличия в соотношении субстрат/продукт относительно контрольных растений с экспрессией eGFP белка, при этом, значимых отличий между растениями с разной локализацией белка, по-видимому, нет. Таким образом, для *N. benthamiana* можно говорить о тенденции (или необходимо привести значение p-value сравнения опытных образцов между собой).
4. В рамках данной работы было бы очень интересно оценить антиоксидантную емкость контрольных и опытных растений, поскольку изменение жирнокислотного состава может сказываться на динамике протекающих свободнорадикальных реакций.

Все вышеперечисленные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств и значения работы.

4. Опубликование результатов диссертации в научной печати

Диссертация Берестового М.А. прошла достаточно широкую апробацию на российских и международных конференциях. Результаты и выводы работы в полном объеме представлены в печатных работах, включающих в себя 3 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

5. Содержание автореферата

Содержание автореферата отражает основные положения диссертации и является кратким и точным изложением важных разделов диссертационной работы.

б. *Заключение*

В целом, можно заключить, что представленная работа имеет большое значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов биотехнологии, является добротным законченным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне. По содержанию, актуальности выбранной темы, структуре и уровню выполнения поставленных задач, степени обоснованности выносимых на защиту положений и выводов, значительной теоретической и практической значимости диссертационная работа Берестового Михаила Алексеевича «Дельта-9-Ацил-липидная десатураза: локализация и функциональная роль в растительной клетке» полностью соответствует требованиям и критериям пунктам 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Васина Дарья Владимировна

кандидат биологических наук
научный сотрудник лаборатории
молекулярных основ биотрансформаций
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
E-mail: d.v.vasina@gmail.com, тел. +79104616500

Подпись Д.В. Васиной заверяю

Ученый секретарь

Федерального государственного учреждения

«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

3 июня 2020 г.