

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук **Берестового Михаила Алексеевича «ДЕЛЬТА-9-АЦИЛ-ЛИПИДНАЯ ДЕСАТУРАЗА: ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ**

», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Мембраны обеспечивают целостность протопласта и органелл, компартментализуют биохимические процессы в клетке, осуществляют транспортную и рецепторную функции. Изменение текучести мембран, которое достигается вариабельностью содержания ненасыщенных жирных кислот, влияет не только на структуру и свойства самих мембран, но и на функциональную активность белков, локализованных на мембранах. В растениях, которые, в отличие от животных, не могут уклоняться от действия неблагоприятных факторов, рецепция сигналов и запуск адаптивных реакций во многом зависит от целостности плазмалеммы и внутриклеточных мембран. Десатуразы жирных кислот, играющие ключевую роль в процессе образования ненасыщенных жирных кислот, и, в первую очередь, дельта-9-ацил-АПБ десатураза ( $\Delta 9$  десатураза), которая образует первую двойную связь в цепи жирных кислот, привлекают пристальное внимание не только «фундаментальных» биологов, но также фитопатологов и биотехнологов. Одним из «белых» пятен в изучении десатураз является недостаточное знание связи их функциональной активности и внутриклеточной локализации. Предполагается, что в растениях растворимые ацилАПБ десатуразы локализованы в хлоропластах (пластидах), тогда как мембраносвязанные ацил-липидные десатуразы - в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Тем не менее, имеющиеся литературные данные не исключают того, что ацил-липидные десатуразы могут функционировать и в ЭР. Исследование гетерологичной экспрессии хорошо изученных генов десатураз с использованием векторных конструкций, включающих специфические последовательности, обеспечивающие транспорт белка в определенные компартменты клетки, - удобный способ проверить такую гипотезу.

Диссертантом была проведена большая экспериментальная работа с привлечением современных, информативных методов молекулярной биологии, микроскопии, физиологии и биохимии растений, результаты которой были опробированы на многочисленных конференциях и опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

М.А.Берестовым были впервые созданы экспрессионные векторные конструкции, несущие нативный и рекомбинантный ген *desC* цианобактерии *Synechococcus vulcanus* с регуляторными последовательностями, обеспечивающими локализацию белкового продукта целевого гена в хлоропластах, ЭР и цитоплазме. Диссертантом была разработана система транзientной экспрессии генов, удобная как для оценки сигнальных последовательностей, так и для изучения локализации гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы в растительной клетке. Важно, что выбор был сделан в пользу наиболее информативной системы с использованием протопластов, которая, тем не менее, является значительно более трудоемкой по сравнению с «быстрой» системой на основе эпидермальных клеток, используемой наиболее часто. Показано, что разработанные векторы направляют белковые продукты целевого гена в специфические компартменты клетки. Продемонстрировано, что локализация белкового продукта гена *desC* в цитоплазме приводит к достоверному изменению состава и массовой доли насыщенных и ненасыщенных ЖК и суммарных липидов в листьях растений. М.А.Берестовым были получены приоритетные данные о влиянии экспрессии гетерологичной дельта-9-ацил-липидной десатуразы в зависимости от ее локализации в растительной клетке и в зависимости от видовой принадлежности используемых растений.

Вместе с тем, к работе имеется ряд вопросов и замечаний.

В методике выделения протопластов, вероятно, пропущена стадия стерилизации ферментного раствора через микрофилтры. Не указано, оценивали ли жизнеспособность протопластов после выделения.

В работе изучали состав жирных кислот (табл.4,5, рис.3), а также функциональную активность  $\Delta 9$  десатуразы (рис.4-5) во фракции «цитоплазма», «хлоропласты» и «ЭР». В методике не указано как осуществляли фракционирование органелл и что представляет компартмент «цитоплазма».

Одной из задач исследования является «Сконструировать векторы... с последовательностями, обеспечивающими специфическую локализацию белковых продуктов целевого гена в различных компартментах клетки (в хлоропластах, ЭПР и цитоплазме)». Хотелось бы знать, какие специфические последовательности обеспечивают локализацию белка в цитоплазме?

На рис.2 представлен анализ субклеточной локализации слитых с GFP белков в протопластах табака, полученных из клеток агроинфицированной области листьев. Не указано, для какого вида *N. benthamiana* или *N. excelsior* проведен этот анализ. Можно предположить, что если «Наибольшая активность гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы у *N. benthamiana* наблюдается в хлоропластах, а у *N. excelsior* в ЭПР» (вывод 7), то на уровне конфокальной микроскопии такие различия тоже могут быть выявлены.

К сожалению, за пределами автореферата осталось обсуждение (гипотеза), объясняющая почему «Наибольшая активность гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы у *N. benthamiana* наблюдается в хлоропластах, а у *N. excelsior* в ЭР». Не обсуждается также, почему в качестве «промежуточной» структуры для синтеза ненасыщенных ЖК в цитоплазме рассматриваются липидные тельца (согласно рис.6), а не пероксисомы или мембранные везикулы.

Вывод 3 слишком общий, его следовало связать с проведенными исследованиями, например, «Получены векторы... с сигнальными последовательностями, которые направляют белковые продукты целевого гена в специфические компартменты клетки».

В автореферате имеются неудачные выражения «дискриминировать локализацию» (с.11), ошибки в написании: «по средствам десатурации» (с.3), видовые названия растений с большой буквы; неудачные фразы: «Поскольку дельта-9-ациллипидная десатураза относится к классу мембраносвязанных десатураз и не может функционировать, не будучи интегрированной в мембрану она демонстрирует функциональную активность»(с.15).

В целом, несмотря на приведенные замечания, следует заключить, что диссертационная работа М.А.Берестового выполнена на высоком методическом уровне, отличается научной новизной, аргументированностью основных положений, грамотностью в обсуждении изучаемых вопросов. Работа имеет не только высокую теоретическую значимость, но и практическое применение, и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп.9-11, 13, 14 «Положения о присвоении учёных степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г.), а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

#### Контактные данные

Румянцева Наталья Ивановна

кандидат биологических наук

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Ведущий научный сотрудник, зав. группой «Биология клеток *in vitro*»

Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение

Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН»

420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31

Тел: +7(843)231-90-42, факс: +7(843)292-73-47

[nat\\_rumyantseva@mail.ru](mailto:nat_rumyantseva@mail.ru)

Подпись 

ЗАВЕРЯЮ

НАЧАЛЬНИК  
ОТДЕЛА ПРОТОКОЛА  
И ДЕЛОПРОИЗВОДСТВА

« 15 » 06

20 2013

