



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

26.05.2020 № 4.10-48-985

на № _____ от _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Институт биоорганической химии
им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)»
академик РАН
А. Г. Габиров

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Берестового Михаила Алексеевича на
тему: «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).

Актуальность темы диссертационной работы

Формирование стрессовых ответов растений представляет собой приоритетный предмет изучения во всем мире. Одним из механизмов борьбы со стрессом является поддержание гомеостаза клеточных мембран растений за счет модуляции ненасыщенности мембранных липидов. Этот процесс реализуется путем десатурации жирных кислот (ЖК) специфическими ферментами десатуразами, которые катализируют превращение насыщенных ЖК в ненасыщенные. Это приводит к разжижению липидного бислоя и предотвращает его фазовый переход в более твердое состояние. Такой фазовый переход может привести к гибели клетки из-за нарушения функциональности мембранных белков и полному разрушению мембраны. Дельта-9-ацил-липидная десатураза является ключевым ферментом в этом процессе, поскольку отвечает за образование первой двойной связи в цепях ЖК. Отсутствие хотя бы одной ненасыщенной ЖК, приводит к нарушению нормального функционирования клеточных мембран. Несмотря на значительные успехи, наши знания в отношении функционирования большого количества десатураз недостаточны. Особенно актуальным представляется поиск взаимосвязей локализации конкретных типов десатураз в различных компартментах растительных клеток и их функциональной эффективностью. Решение таких фундаментальных задач по пониманию молекулярно-генетических механизмов стрессовых ответов у растений находит непосредственное применение в биотехнологическом производстве и современном сельском хозяйстве.

Диссертационная работа Берестового Михаила Алексеевича посвящена данной

проблематике. В качестве модельного объекта выбран хорошо изученный ген *desC* кодирующий дельта-9-ацил-липидную десатуразу цианобактерий *Synechococcus vulcanus*. Основной задачей диссертанта являлась разработка системы транзientной экспрессии генов десатуразы для оценки функциональной эффективности ее в различных компартментах клетки. Полученные в результате исследования новые данные о взаимосвязи локализации дельта-9-ацил-липидной десатуразы и ее функциональной эффективности свидетельствует об актуальности диссертационной работы.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, изложена на 102 страницах, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, представление результатов и их обсуждение, выводы и список использованной литературы, включающий 148 источников.

Во введении сформулированы и кратко обоснованы цель и задачи исследования. В первом разделе главы обзора литературы кратко описывается роль растительных десатураз жирных кислот, в том числе дельта-9 десатураз в процессе модуляции ненасыщенности мембранных липидов. Во втором разделе обзора литературы приведены существующие на сегодняшний день классификации десатураз, а также описывается их структура, механизм функционирования и локализация. Раздел 1.3 посвящен экспрессии и регуляции генов десатураз, в том числе приведены факторы их активации. В разделе 1.4 подробно описана роль растительных десатураз в поддержании гомеостаза клеточных мембран и приведены современные данные исследований данного вопроса. Раздел 1.5 посвящен биотехнологическому потенциалу применения десатураз в создании устойчивых к абиотическим стрессам растений, в том числе сельскохозяйственных культур.

Материал обзора современен и доступно изложен хорошим языком. Автором в полной мере и корректно проанализированы современные данные о локализации, строении и механизмах функционирования растительных десатураз. Аналогичным образом проанализированы современные подходы, используемые как для исследования роли десатураз в процессе модуляции ненасыщенности мембранных липидов, так и модификаций липидного метаболизма растений.

После обзора литературы приведено описание материалов и методов исследования. В главе 2 соискателем детально изложены протоколы и методические особенности выполненных работ. Приводится описание используемых генно-инженерных методов, описана методика получения генетических конструкций для экспрессии целевого белка, методика выращивания агробактерий, их трансформации и селекции, а также процедура агроинфильтрация растений, методика выделения протопластов и их анализ с помощью лазерной сканирующей и флуоресцентной микроскопии. Подробно изложена методика выделения метиловых эфиров жирных кислот из тканей листьев табака и их анализ с помощью газо-жидкостной хроматографии / масс-спектрометрии (ГЖХ-МС). Статистическая обработка приведена в заключительном разделе главы Материалы и методы исследования. Описанный материал подтверждает корректность выбора методов исследования.

Глава 3 посвящена результатам исследования. Следует отметить, что эксперименты спланированы и проведены на хорошем профессиональном уровне, а достоверность полученных результатов не вызывает сомнения, что позволило решить поставленные в ходе работы задачи.

Первый раздел главы 3 посвящен описанию созданных экспрессионных векторов. Приведены особенности каждой из серий векторов и представлены наглядные их схемы. Первая серия векторов была использована для изучения субклеточной локализации гетерологичной десатуразы в растительных клетках и несл последовательность гибридного гена *desC-egfp* слитого с лидерными последовательностями, обеспечивающими локализацию целевого белка в ЭПР и хлоропластах. Вторая серия векторов использовалась для сравнительного анализа модуляции ЖК состава липидов растений в зависимости от субклеточной локализации гетерологичной дельта-9-ацил-липидной десатуразы и несл

последовательность, кодирующую нативный ген *desC* слитый с аналогичными последовательностями для локализации белка в ЭПР и хлоропластах.

В разделе 3.2 описаны результаты агроинфильтрации растений табака и представлена оценка экспрессии гибридного гена в растительных тканях в виде фотографии листа табака экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок GFP.

Раздел 3.3 посвящен установлению локализации гибридного белка (DesC-GFP) по флуоресценции в различных компартментах клетки с использованием агроинфильтрированной ткани. Приведена фотография ткани листа табака экспрессирующей GFP, полученная с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Автором отмечена невозможность использования ткани листьев табака для оценки локализации целевых белков. Далее автор приводит результаты анализов субклеточной локализации слитых с GFP белков в протопластах табака, полученных из клеток агроинфильтрированной области листьев с помощью флуоресцентной микроскопии. На рисунке 9 автором представлены хорошие изображения отдельных протопластов по которым можно, с высокой долей вероятности, локализовать флуоресценцию в определенных компартментах растительной клетки. В частности флуоресценция наблюдается в ЭПР, хлоропластах и цитоплазме.

В разделе 3.4 представлен анализ жирнокислотного состава суммарных липидов тканей листьев *Nicotiana benthamiana* и *Nicotiana excelsior* экспрессирующих ген *desC*, белковый продукт которого локализован в ЭПР, хлоропластах и цитоплазме. Результаты сгруппированы в пять таблиц и тепловой карте изменений содержания ЖК в листьях трансформированных растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* в процентах от контроля принятого за 100%.

Раздел 3.5 посвящен результатам, которые позволяют определить оптимальную внутриклеточную локализацию дельта-9-ацил-липидной десатуразы. Автор делает вывод о приоритетной локализации в хлоропластах дельта-9-ацил-липидной десатуразы по отношению продукта реакции десатурации к его субстрату (массовая доля олеиновой ЖК, к массовой доле стеариновой ЖК).

Глава 4 посвящена обсуждению полученных результатов.

Первоначально автор формулирует центральные вопросы, на основании которых обосновывает причины выбора метода и объекта исследования. Метод транзientной экспрессии был выбран ввиду того, что систему стабильной трансформации для многих растений не просто разработать. Выбор объекта логично пояснен хорошей его изученностью в совокупности с полученным заделом по данной тематике. Автор подробно описывает результаты сравнения ЖК состава трансфицированных (вектором несущим нативный белок GFP) и нетрансфицированных листьев двух видов табака. Автор отмечает, что сама по себе процедура агроинфильтрации не вызывает активацию экспрессии собственных десатураз растений в том числе дельта-9 десатураз. Результаты сравнения изменений содержания ЖК в листьях растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* экспрессирующих нативный ген *desC* показали, что у растений *N. benthamiana* уменьшается содержание одной из основных насыщенных кислот - пальмитиновой ЖК, вне зависимости от локализации, а другой - стеариновой - увеличивается. При этом количество мононенасыщенной пальмитолеиновой ЖК не изменяется, а количество олеиновой достоверно увеличивается. Помимо этого, у растений отмечено значительное увеличение и основных триеновых жирных кислот - руаниновой и α -линоленовой. Для *N. excelsior* наблюдается похожая картина, за исключением содержания стеариновой ЖК, которое увеличивается. При этом количество олеиновой ЖК снижается или сохраняется на уровне контроля. В целом, отмечается увеличение индекса ненасыщенности ЖК при экспрессии гена *desC* по сравнению с контролем у двух видов табака. Автором выдвинута обоснованная гипотеза объясняющая накопление в листьях преимущественно полиненасыщенных ЖК. А именно, транзientная экспрессия гетерологичной дельта-9-ацил-липидной десатуразы приводит к накоплению конечных продуктов реакции десатурации (полиненасыщенных ЖК) вследствие большей доступности промежуточных продуктов десатурации и/или прямой активации других десатураз растений,

которые вводят последующие двойные связи. В заключительной части главы автор поясняет результаты определения оптимальной внутриклеточной локализации дельта-9-ацил-липидной десатуразы и делает вывод, что наилучшая внутриклеточная локализация для дельта-9-ацил-липидной десатуразы при экспрессии в *N. excelsior* - ЭПР, тогда как для *N. benthamiana* это хлоропласты.

В разделе «Выводы» Берестовой Михаил Алексеевич обобщил полученные экспериментальные данные, обосновал основные положения работы и отметил возможность практического использования полученных результатов.

Оценка оформления диссертационной работы

Диссертационная работа М.А. Берестовой написана хорошим профессиональным языком, все экспериментальные данные представлены в 6 таблицах и 13 рисунках.

Степень новизны результатов научных исследований.

Впервые созданы экспрессионные векторные конструкции, несущие нативный и рекомбинантный ген *desC* (гомолога растительного гена FAD *Arabidopsis thaliana*) цианобактерий *Synechococcus vulcanus* с регуляторными последовательностями, обеспечивающими локализацию белкового продукта целевого гена в различных компартментах растительной клетки. Разработана простая и эффективная система транзientной экспрессии генов, удобная как для оценки сигнальных последовательностей, так и для изучения локализации заданных белков в растительной клетке. Показано, что в разработанной системе транзientной экспрессии сигнальные последовательности направляют белковые продукты целевого гена строго в специфические компартменты растительной клетки. Продемонстрировано, что локализация белкового продукта гена *desC* в цитоплазме приводит к достоверному изменению состава и массовой доли насыщенных и ненасыщенных жирных кислот суммарных липидов в листовой ткани растений. Получены приоритетные данные о влиянии экспрессии гетерологичной дельта-9-ацил-липидной десатуразы на липидный метаболизм растений в зависимости от ее локализации в клетке и видовой принадлежности растений, на примере двух видов растений табака.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационная работа Берестовой Михаила Алексеевича совмещает в себе фундаментальность исследований и их практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для понимания взаимосвязей локализаций десатураз и их функциональной эффективности. С практической точки зрения, полученные соискателем данные, могут стать основой при создании трансгенных растений, которые будут использоваться в качестве моделей при изучении роли модуляции ненасыщенности ЖК в защитных ответах на неблагоприятные условия окружающей среды. Более того, подходы и результаты могут быть использованы непосредственно в создании хозяйственно ценных растений устойчивых к стрессовым воздействиям и растений с измененным метаболизмом, что особенно актуально для получения растительных масел с заданными свойствами. Такие растения могут быть востребованы в промышленности, производстве продуктов питания, фармацевтике и медицине.

Обоснованность и достоверность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований классических и современных молекулярно-биологических, биохимических методов и методов физиологии растений, а также методов анализа и статистической обработки экспериментального подтверждают обоснованность и достоверность полученных экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе М.А. Берестовой, а также выносимых на защиту выводов и положений.

Результаты диссертации рекомендуются для использования в научно-исследовательских учреждениях биотехнологического и образовательного профиля, занимающихся изучением физиологии растений и созданием трансгенных растений с измененным метаболизмом для фундаментальных и практических исследований. Изложенные подходы и полученные результаты рекомендуются для включения в учебном процессе при чтении спецкурсов по физиологии растений, биотехнологии и молекулярной биологии.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации М.А. Берестового опубликованы в 4 работах (в том числе 3 статьях в журналах, рекомендованных ВАК России). Результаты исследований апробированы на Российских и Международных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При критическом рассмотрении диссертационной работы возник ряд вопросов и замечаний:

1. В главе «Обзор литературы» практически нет информации о дельта-9-ацил-липидной десатуразе цианобактерий и недостаточно сведений о дельта-9 десатуразах растений. Дополнение этими сведениями помогло бы лучше понять выбор объекта исследования.
2. Во втором положении, выносимого на защиту не совсем корректно сформулировано: «Векторы направляли белковые продукты...».
3. Несмотря на большой объем выполненных исследований в диссертации приведено мало цитологических фотографий, а именно протопластов с флюоресценцией и тканей листьев, экспрессирующих гибридный белок DesC-GFP. Кроме того, представленные в работе фотографии относятся только к виду *N. benthamiana*.
4. На основании рисунка, демонстрирующего отношение продукт-субстрат в трансформированных листьях *N. benthamiana* автор делает вывод, что хлоропласты лучшее место для экспрессии дельта-9-ацил-липидной десатуразы. Данный вывод может быть не совсем корректным, поскольку отношение продукт-субстрат при локализации дельта-9-ацил-липидной десатуразы в цитоплазме, хлоропластах и ЭПР отличаются друг от друга не значительно. Планируются ли дополнительные исследования данного факта?
5. Автором допущена ошибка при нумерации рисунка 11, в виде дублирования. Причем отсутствует ссылка в тексте раздела 3.4 на первый представленный «рисунок 11».
6. Представляется лишним указывать таблицу 4, поскольку она повторяет данные предыдущих таблиц.
7. На странице 35 автором указано влияние накопления Na_2 и Cl_2 на метаболизм липидов. Видимо имеется ввиду ионы Na и Cl ?
8. Имеются орфографические ошибки и неточности:
 - на стр. 5 «по средствам» вместо «посредством», пропущена запятая в предпоследнем предложении перед «вводя» и лишняя запятая в последнем.
 - на стр.7 во втором предложении отсутствует запятая и используется «влияния» вместо «влияние».
 - отсутствует расшифровка в списке сокращений «ПНЖК», ДРН.
 - на стр. 27 некорректное словосочетание «тканеспецифичной манере»
 - на стр. 52 «...раствор готовили предварительно, осветляли центрифугированием...», где «осветляли» лишнее и др.
9. Ряд опечаток встречаются в списке литературы и ссылках. Так, в тексте Bonawitz представлен 2018 г., а в списке литературы – 2019; Odipio et al. - 2018, а в списке 2017 и др. Отсутствует «Stuart, 1979» в списке литературы.

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей хорошее впечатление.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Результаты представленной к защите диссертации свидетельствуют о высокой квалификации ее автора – Берестового Михаила Алексеевича. Исследование выполнено и изложено в понятной последовательности, которая полностью отражает логику реализации конечной цели всей работы – изучить физиологическую роль дельта-9-ацил-липидной десатуразы в молекулярном механизме модуляции ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов растений, в зависимости от ее локализации в клетке.

В настоящей работе диссертантом использованы современные и классические методы молекулярной биологии, биохимии и физиологии растений. М.А. Берестовой обладает высоким уровнем квалификации и хорошо знаком с литературой по теме диссертации. Список использованной литературы составляет 148 источников, большинство из них на английском языке. Следует отметить правильность выбранной стратегии исследования, грамотное планирование экспериментов, высокое качество результатов и обоснованность сделанных выводов, что положительно характеризует самого исследователя. Все вышеизложенное свидетельствует о соответствии соискателя М.А. Берестового ученой степени кандидата биологических наук.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

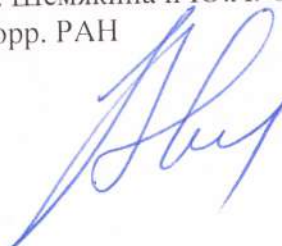
Диссертационная работа Берестового Михаила Алексеевича на тему «Дельта-9-Ацил-липидная десатураза: локализация и функциональная роль в растительной клетке» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение для решения вопросов в области биотехнологии. По актуальности темы, новизне результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа 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. Считаем, что автор Берестовой Михаил Алексеевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв обсужден на семинаре отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Протокол № 27 от "22" 04 2020г.).

Научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и протеомики растений
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
кандидат биологических наук
Князев Андрей Николаевич



Заведующий отделом молекулярной биологии и биотехнологии растений Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН
Завриев Сергей Кириакович



« 26 » мая 2020 г.