

Отзыв официального оппонента

доктора биологических наук **Калинина Владимира Ивановича** на диссертацию **Шкрыля Юрия Николаевича** «Агробактериальные гены *rol* как активаторы биосинтеза вторичных метаболитов и стрессоустойчивости клеток растений», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности

1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Известно, что почвенные бактерии *Rhizobium rhizogenes* переносят область транспортной ДНК (Т-ДНК) плазмиды Ri в геном растений. Это явление лежит в основе природного механизма горизонтального переноса генов между про- и эукариотическими организмами и приводит к появлению трансгенных растений. Т-ДНК агробактерий содержит гены, обеспечивающие биосинтез опинов и растительных гормонов, а также гены семейства *plst*, к которым, в частности, относятся гены *rol*, вызывающие неопластический рост с образованием «волосатых» корней и другие изменения в трансформированных растениях и клеточных культурах.

Гены *rol* давно привлекают внимание необычными свойствами, особенностями происхождения и эволюции. Они также обладают существенным потенциалом в биотехнологии. Эти гены играют роль регуляторов жизнедеятельности растений, влияя на гормональный баланс, защитные реакции и биосинтез вторичных метаболитов. К моменту начала работы имелись серьезные пробелы в понимании механизмов их действия на молекулярном уровне, что ограничивало практическое использование этих генов. Белки, кодируемые генами *rol*, не гомологичны каким-либо белками растений или бактерий. Данные об их ферментативной активности недостаточны и противоречивы. Кроме того, гены *rol* могут оказывать плейотропное влияние на процессы роста и вторичного метаболизма. Поэтому изучение молекулярных и клеточных механизмов действия генов *rol*, а также исследование характера их влияния на процессы биосинтеза в растительных клетках весьма актуально.

Клеточные культуры растений являются уникальной моделью для изучения молекулярных и физиологических процессов в контролируемых условиях, включая и воздействие генов *rol* на растения. Культуры клеток обеспечивают генетически однородный материал, что повышает воспроизводимость результатов. Кроме того, клеточные культуры растений используются для получения вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологической активности, включая антиоксидантную, антимикробную, противовоспалительную и противоопухолевую активность. Методы генетической инженерии, в том числе создание трансгенных растений и их клеточных

культур с использованием генов *rol*, значительно расширяют возможности модификации вторичного метаболизма. Эти изменения увеличивают биотехнологический потенциал клеточных культур, делая их более эффективными для производства ценных метаболитов.

Ранее считалось, что функция генов *rol* состоит в воздействии на гормональный статус клеток, подвергнувшихся трансформации. Однако такое упрощенное понимание уже утратило актуальность, так как появились сведения о влиянии этих генов на разнообразные аспекты жизнедеятельности растительных клеток, не зависящие прямо от действия фитогормонов. Оставался нерешенным вопрос о воздействии генов *rol* на экспрессию генов, отвечающих за синтез вторичных метаболитов, а также о стабильности индуцированных изменений в метаболизме растений и культур растительных клеток. Влияние генов *rol* в контексте генерации и детоксикации активных форм кислорода (АФК) оставалось неизученным, несмотря на значительный интерес для биотехнологии, поскольку АФК влияют на адаптацию растений к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Таким образом, тема исследования представляется весьма актуальной.

Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результаты и обсуждения, Заключение, Выводов, Списка сокращений и Списка литературы, насчитывающего 802 наименования, в том числе три на русском языке.

Во Введении изложены представления автора об актуальности темы исследования, степень разработанности темы, сформулированы цели и задачи исследования, новизна и практическая значимость работы, охарактеризованы методология и методы исследования, а также сформулированы основные положения, выносимые на защиту. В Обзоре литературы изложена информация о переносе генов агробактериями, дана общая характеристика генов *rol*, приведены сведения о структурной и функциональной организации сигнальных систем растений, о роли АФК в сигнальной регуляции и стрессах растений, данные о вторичных метаболитах, изучаемых в работе растений и их клеточных культур, а также другая информация, полезная для понимания работы. В Материалах и методах описываются использованный растительный материал, а также бактерии и плазмиды, процедура создания вектора для анализа внутриклеточной локализации белка *RolC*, культивирование и трансформация бактерий, выделение ДНК, РНК и синтез первой цепи кДНК, химический анализ клеточных культур, определение фармакологической активности метаболитов и экстрактов, определение АФК, определение жизнеспособности клеток растений, анализ содержания восстановленного и окисленного глутатиона методом масс-спектрометрии идентификация генов НАДФН-оксидаз, кальций-зависимых протеинкиназ, ПЦР в реальном времени и т.д. В главе «Результаты и обсуждение» подробно обсуждаются результаты исследования и их интерпретация, это самая большая глава

диссертации. В Заключении подробно и в произвольной форме суммируются и обобщаются результаты диссертационного исследования, что также очень полезно для понимания сути работы.

В ходе выполнения диссертационной работы соискателем проводилось выявление молекулярных механизмов влияния агробактериальных генов *rol* на биосинтез природных соединений, выработку АФК и стрессоустойчивость растительных клеток к различным неблагоприятным абиотическим факторам.

Им было установлено, что гены *rolA* и *rolB* длительное время поддерживают интенсивный биосинтез антрахинонов в трансгенных клеточных культурах марены сердцелистной путем активации экспрессии изохоризмат-синтазы (*ICS*), О-сукцинилбензоат-КоА-синтазы (*OSBS*) и О-сукцинилбензоат-КоА-лигазы (*OSBL*) и изопентенилдифосфат-дельта-изомеразы (*IPPi*). Интересно, что максимальный эффект гена *rolB* проявляется сразу после трансформации, в то время как *rolA* действует постепенно. Таким образом, используя метод генетической трансформации генами *rol* соискателем достигнута эффективная активация вторичного метаболизма в клетках лекарственных растений. Так, в клеточной культуре марены сердцелистной это позволило многократно увеличить продукцию антрахинонов, а в трансформированных корнях кирказона маньчжурского концентрация магнофлорина превысила аналогичный показатель дикорастущего растения.

Соискателем впервые была показана способность как самих генов *rol*, так и в составе нативной Т-ДНК агробактерий к ингибированию продукции внутриклеточных АФК. Ингибирование происходило как в нормальных условиях, так и при воздействии стрессовых факторов. Последнее приводило к росту устойчивости трансгенных клеток к абиотическим стрессам. Было выяснено, что гены *rol* по-разному регулируют пути генерации и детоксикации АФК трансгенных клеток. Ген *rolC* уменьшает синтез АФК, ингибируя экспрессию НАДФН-оксидаз, в то время как ген *rolB* активировал транскрипцию генов антиоксидантных ферментов.

Также было охарактеризовано воздействие гена *rolB* на биогенез микроРНК, и экспрессию белков теплового шока, а также циклофилинов, которые связаны с гормональной регуляцией и защитными реакциями. Было впервые установлено, что ген *rolB* активировал экспрессию генов, участвующих в формировании, стабилизации и функционировании микроРНК, включая модуляцию экспрессии гена *RACK1A*. Также было показано, что ген *rolB* действует на экспрессию генов, связанных с гормональной регуляцией, защитными реакциями и кальциевой сигнальной системой, причем наиболее

заметные изменения происходят в регуляции транскрипционной активности белков теплового шока и некоторых циклофилинов.

Соискателем выполнен огромный объем работы на самом высоком методическом уровне с использованием современных подходов биотехнологии, геной инженерии и молекулярной биологии растений. В число использованных инструментальных методов входили ПЦР в реальном времени, жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией, конфокальная микроскопия, а также секвенирование ДНК. В ходе выполнения диссертационной работы использовали базы данных GenBank и TAIR. Для анализа экспериментальных данных применяли специализированные программные пакеты. Диссертант продемонстрировал грамотную статистическую обработку данных, что обеспечивает достоверность и объективность результатов исследования. Работа выполнена на высоком уровне и оставляет положительное впечатление.

Материалы диссертационной работы опубликованы в международных научных журналах, приравненных к журналам списка ВАК и реферируемых международными базами данных WOS и Scopus – 17 статей, в других периодических и сериальных изданиях – 3 статьи и материалах межрегиональных и международных научных конференций – 11 тезисов и трудов конференций. Содержание автореферата полностью отражает текст диссертации.

Работа написана хорошим литературным языком и читается с большим интересом. Текст почти свободен от опечаток и неудачных выражений. Замечаний по формулировкам выводов и положений, выносимых на защиту, не имеется.

Вопросы и замечания, о которых можно упомянуть:

1. В разделах литературного обзора, посвященных вторичным метаболитам растений, не приводятся химические формулы этих веществ, что затрудняет понимание работы.
2. Не приведены имена специалистов, определявших растительный материал.
3. Фраза на стр. 102 «После центрифугирования при 10000 об/мин в течение 10 мин образцы фильтровали через 0,2 мкм политетрафторэтиленовую мембрану (Supelco, США)» некорректна, поскольку непонятно, что именно фильтровали – надосадочную жидкость или осадок.
4. Стр. 103. Метилцианид лучше называть более распространенным термином ацетонитрил.
5. Стр. 103. «режим отрицательных ионов» лучше заменить на «режим регистрации отрицательных ионов».

6. Стр. 104. «В режиме отрицательных и положительных ионов» лучше заменить «В режиме регистрации отрицательных и положительных ионов».
7. Стр. 109. Чем обусловлен выбор зондов, H₂DCF-DA и H₂R123, для детектирования внутриклеточных АФК? Существует ли принципиальное различие между ними?
8. Глава 3.2.2. Какие функциональные особенности белка *rolC* могут объяснить его распределение в цитоплазме и ядре, включая ядрышки?
9. Какие механизмы могут лежать в основе антагонистического действия генов *rolC* и *rolB* в регуляции экспрессии генов NADPH-оксидаз и антиоксидантной системы в клетках *A. thaliana* и *R. cordifolia*, и как эти различия влияют на адаптационные реакции растений к абиотическим стрессам?

Следует отметить, что высказанные мною вопросы и замечания носят рекомендательный характер и не влияют на выводы и результаты представленной работы.

Соискателем установлено, что гены *rol* не только обладают уникальной способностью активировать вторичный метаболизм растений, но и сохраняют свой эффект на протяжении длительного культивирования трансгенных клеточных культур. Получены сведения о молекулярно-генетических механизмах активирующего сигнала отдельных генов *rol* и эффекты их совместного применения. Было также показано, что хотя высокий уровень транскрипционной активности гена *rolB* усиливает биосинтез целевых вторичных метаболитов, избыточная экспрессия этого гена может уменьшать пролиферацию клеток. Это требует отбора подходящих клеточных линий при создании *rolB*-трансгенных культур с оптимальной величиной экспрессии. Было выявлено, что ген *rolC* вызывает меньшую активацию биосинтеза, но способен увеличивать прирост клеточной биомассы, а при совместной экспрессии компенсирует негативное влияние гена *rolB* на пролиферацию клеток. Соискателем также было впервые показано, что при длительном культивировании ген *rolA* вызывает постепенное увеличение биосинтетического потенциала клеток. Все эти выявленные закономерности позволяют более успешно создавать трансгенные клеточные культуры, ориентированные на усиленную продукцию целевых метаболитов, что является очень важным практическим результатом исследования, а также имеют важное общенаучное значение в области биотехнологии и физиологии растений. Также соискатель показал, что гены *rol* обеспечивают защиту растений от различных патогенных факторов, объяснив это воздействием на метаболизм АФК. Выявленные закономерности и обобщения соответствуют по своему уровню сильной докторской диссертационной работе.

Диссертационная работа Шкрыля Юрия Николаевича по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне, безусловно, удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям (п. 9 «Положения о

Сведения об оппоненте

по диссертационной работе Шкрыля Юрия Николаевича
на тему «Агробактериальные гены *rol* как активаторы биосинтеза
вторичных метаболитов и стрессоустойчивости клеток растений»,
представленной на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности
1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Фамилия Имя Отчество оппонента	Калинин Владимир Иванович
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	03.00.04 – биохимия
Ученая степень и отрасль науки	Доктор биологических наук
Ученое звание	нет
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук
Занимаемая должность	Ведущий научный сотрудник лаборатории химии морских природных соединений
Почтовый индекс, адрес	690022, Владивосток, Проспект 100-летия Владивостока, 159
Телефон	+7 (914) 705-08-45
Адрес электронной почты	kalininv@piboc.dvo.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	1. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andrijaschenko P.V., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Chingizova E.A., Ermakova S.P., Malyarenko O.S., Dautov S.S., Kalinin V.I. Structures and bioactivities of quadrangularisides A, A ₁ , B, B ₁ , B ₂ , C, C ₁ , D, D ₁ –D ₄ , and E from the sea cucumber <i>Colochirus quadrangularis</i> : the first discovery of the glycosides, sulfated by C-4 of the terminal 3-O-methylglucose residue. synergetic effect on colony formation of tumor HT-29 Cells of these glycosides with radioactive irradiation // Marine Drugs. 2020. Vol. 18, No. 8. Art. 394 [1–35].

2. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andrijaschenko P.V., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Chingizova E.A., Kalinin V.I. Kurilosides A₁, A₂, C₁, D, E and F – triterpene glycosides from the Far Eastern sea cucumber *Thyonidium* (= *Duasmodyla*) *kurilensis* (Levin): structures with unusual non-holostane aglycones and cytotoxicities // *Marine Drugs*. 2020. Vol. 18, No. 11. Art. 551 [1–21].
3. Kalinin V.I. Echinoderms metabolites: structure, functions, and biomedical perspectives // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19, No. 3. Art. 125 [1–4].
4. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andrijaschenko P.V., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Chingizova E.A., Kalinin V.I. Triterpene glycosides from the Far Eastern sea cucumber *Thyonidium* (= *Duasmodyla*) *kurilensis* (Levin): the structures, cytotoxicities, and biogenesis of kurilosides A₃, D₁, G, H, I, I₁, J, K, and K₁ // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19, No. 4. Art. 187 [1–25].
5. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andrijaschenko P.V., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Chingizova E.A., Kalinin V.I. Unusual structures and cytotoxicities of chitonoidosides A, A₁, B, C, D, and E, six triterpene glycosides from the Far Eastern sea cucumber *Psolus chitonoides* // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19, No. 8. Art. 449 [1–18].
6. Zelepuga E.A., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I. Structure-activity relationships of holothuroid's triterpene glycosides and some in silico insights obtained by molecular dynamics study on the mechanisms of their membranolytic action // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19, No. 11. Art. 604 [1–22].
7. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andrijaschenko P.V., Popov R.S., Chingizova E.A., Kalinin V.I., Dmitrenok P.S. Triterpene glycosides from the Far Eastern sea cucumber *Psolus chitonoides*: chemical structures and cytotoxicities of chitonoidosides E₁, F, G, and H // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19, No. 12. Art. 696 [1–17].

8. Silchenko A.S., Avilov S.A., Andrijaschenko P.V., Popov R.S., Chingizova E.A., Dmitrenok P.S., Kalinovskiy A.I., Rasin A.B., Kalinin V.I. Structures and biologic activity of chitonoidosides I, J, K, K₁ and L-triterpene di-, tri- and tetrasulfated texaosides from the sea cucumber *Psolus chitonoides* // Marine Drugs. 2022. Vol. 20, No. 6. Art. 369 [1–21].
9. Kalinin V.I., Silchenko A.S. Echinoderms metabolites: structure, functions and biomedical perspectives II // Marine Drugs. 2022. Vol. 20, No. 8. Art. 492 [1–5].
10. Silchenko A.S., Avilov S.A., Andrijaschenko P.V., Popov R.S., Chingizova E.A., Grebnev B.B., Rasin A.B., Kalinin V.I. The isolation, structure elucidation and bioactivity study of chilensosides A, A₁, B, C, and D, holostane triterpene di-, tri- and tetrasulfated pentaosides from the sea cucumber *Paracaudina chilensis* (Caudinidae, Molpadida) // Molecules. 2022. Vol. 27, No. 21. Art. 7655 [1–18].
11. Silchenko A.S., Avilov S.A., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Chingizova E.A., Grebnev B.B., Rasin A.B., Kalinin V.I. Chilensosides E, F, and G-new tetrasulfated triterpene glycosides from the sea cucumber *Paracaudina chilensis* (Caudinidae, Molpadida): structures, activity, and biogenesis // Marine Drugs. 2023. Vol. 21, No. 2. Art. 114 [1–14].
12. Ivanchina N.V., Kalinin V.I. Triterpene and steroid glycosides from marine sponges (*Porifera*, *Demospongiae*): structures, taxonomical distribution, biological activities // Molecules. 2023. Vol. 28, No. 6. Art. 2503 [1–30].
13. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Chingizova E.A., Menchinskaya E.S., Panina E.G., Stepanov V.G., Kalinin V.I., Stonik V.A. Djakonoviosides A, A₁, A₂, B₁–B₄ – triterpene monosulfated tetra- and pentaosides from the sea cucumber *Cucumaria djakonovi*: the first finding of a hemiketal fragment in the aglycones; activity against human breast cancer cell lines // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24, No. 13. Art. 11128 [1–24].

		<p>14. Popov R.S., Ivanchina N.V., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Malyarenko T.V., Stonik V.A., Dmitrenok P.S. A mass spectrometry database for sea cucumber triterpene glycosides // <i>Metabolites</i>. 2023. Vol. 13, No. 7. Art. 783 [1–19].</p> <p>15. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Popov R.S., Chingizova E.A., Menchinskaya E.S., Zelepuga E.A., Panina E.G., Stepanov V.G., Kalinin V.I., Dmitrenok P.S. Sulfated triterpene glycosides from the Far Eastern sea cucumber <i>Cucumaria djakonovi</i>: djakonoviosides C₁, D₁, E₁, and F₁; cytotoxicity against human breast cancer cell lines; quantitative structure-activity relationships // <i>Marine Drugs</i>. 2023. Vol. 21, No. 12. Art. 602 [1–29].</p>
--	--	--

Учёный секретарь ТИБОУ ДВО РАН
К.Х.Н.



Борисова К.Л.

«11» 04 2024 г.

