

Заключение диссертационного совета

99.0.064.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 26 апреля 2022 г., №9

О присуждении Махазену Дмитрию Сергеевичу, российское гражданство, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Регуляция генов семейства JAZ посредством РНК-интерференции как инструмент активации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений» по специальности 1.5.6 – Биотехнология принята к защите 21 февраля 2022 г., протокол №6 диссертационным советом 99.0.064.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН, 690022, г. Владивосток, пр. 100-тия Владивостока, 159, №1108/нк от 16.11.2017 г.

Соискатель Махазен Дмитрий Сергеевич, 11 декабря 1991 года рождения. В 2015 году окончил Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Дальневосточный федеральный университет», в 2019 г. окончил очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН. Работает младшим научным сотрудником в лаборатории биоинженерии ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН с 2016 г. по настоящее время.

Диссертация выполнена в лаборатории биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН.

Научный руководитель – кандидат биологических наук Веремейчик Галина Николаевна, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН, старший научный сотрудник лаборатории биоинженерии.

Официальные оппоненты:

Ермакова Светлана Павловна, доктор химических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, зав. лабораторией химии ферментов;

Мазейка Андрей Николаевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», доцент кафедры биохимии и биотехнологии дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева» РАН, г. Москва в своем положительном отзыве, подписанном д.б.н., ведущим научным сотрудником лаб. биологии культивируемых клеток Носовым Александром Владимировичем, указала, что «диссертационная работа представляет собой самостоятельную научно-квалификационную работу, которая выполнена на высоком научно-теоретическом и методическом уровне. Экспериментальные данные и методические подходы диссертации могут быть использованы в биологических учреждениях и биотехнологических производствах при оптимизации синтеза вторичных соединений в культивируемых клетках растений, а также в учебном процессе по физиологии и биотехнологии растений в вузах. По актуальности темы, новизне результатов, теоретической и практической значимости результатов диссертационная

работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология (биологические науки)».

Соискатель имеет 8 опубликованных работ, из них 5 по теме диссертации, в рецензируемых научных изданиях опубликовано 2 статьи, общим объемом 20 стр., 1 статья в других изданиях, общим объемом 5 стр., 2 работы опубликованы в всероссийской, международной конференциях, общим объемом 9 стр.

Наиболее значительные работы:

1. Makhazen D. S. Inhibition of the JAZ1 gene causes activation of camalexin biosynthesis in Arabidopsis callus cultures / D. S. Makhazen, G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2021. – Vol. 342. – P. 102-113.

2. Makhazen D. S. RNA inhibition of the JAZ9 gene increases the production of resveratrol in grape cell cultures / D. S. Makhazen, G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2021. – Vol. 147. – № 3. – P. 611-618.

3. Махазен Д.С. Новый способ активации вторичного метаболизма в растительных клетках за счет ингибирования экспрессии генов JAZ с помощью РНКинтерференции / Д. С. Махазен // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2017. – №. 4 (194).

На автореферат поступило 8 положительных отзывов из следующих организаций: Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр РАН (д.б.н., проф., зав. лаб. биохимии иммунитета растений Максимов И.В., к.б.н., н.с. Бурханова Г.Ф.); Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (к.б.н., в.н.с. лаб. растительно-микробных взаимодействий Еникеев А.Г.); 3 отзыва из Федерального научного центра агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки (к.с-х-н., с.н.с., и.о. зав.лаб. селекции сои Бутовец Е.С.), (к.б.н., в.н.с. лаб. селекционно-генетических исследований полевых культур

Фисенко П.В.), (н.с. лаб. селекционно-генетических исследований полевых культур Боровая С.А.); Национального центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (к.б.н., с.н.с. лаб. клеточных технологий Яковлев К.В.); 2 отзыва из Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (к.х.н., н.с. лаб. химии природных хиноидных соединений Васильева Е.А.), (к.б.н., с.н.с. лаб. биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ Агафонова И.Г.).

Имеются вопросы:

в отзыве д.б.н. Максимова И.В., к.б.н. Бурхановой Г.Ф., ИБГ РАН

«Как определялся индекс роста и продуктивность культур; как можно объяснить повышение продуктивности резвератрола в трансгенной линии на фоне подавления ее роста? На основании чего были выбраны данные концентрации МеЖК при экзогенной обработке? Почему при запуске механизма РНК-интерференции в растительных клетках снижения роста культуры клеток не наблюдается?»

замечания:

в отзыве к.х.н. Васильевой Е.А., ТИБОХ ДВО РАН

«Отсутствие списка используемых обозначений и сокращений, что усложняет восприятие текста автореферата»;

в отзыве к.б.н. Агафоновой И.Г., ТИБОХ ДВО РАН

«Допускаются некоторые вольности в изложении: на стр.3, третий абзац дано только латинское описание растений без уточнения названия клеточных культур; на стр.4 в разделе «Цель и задачи исследования» говорится о продуктивности клеточных культур винограда и арабидопсиса без привязки к латыни»;

в отзыве к.б.н. Яковлева К.В., ННЦМБ ДВО РАН

«В подписях к рисункам хорошо бы указывать названия растений. По тексту встречаются предложения с пропущенными словами».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается компетентностью в соответствующей отрасли науки ученых, имеющих

публикации в соответствующей сфере исследования, имеющие научные школы, способные определить научную и практическую ценность диссертации, давшие своё согласие (пп. 22,24 Положения от 24.09.2013 г., №842).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная концепция подавления экспрессии генов-супрессоров, принадлежащих к семейству *JAZ* при помощи механизма РНК-интерференции, для получения клеточных культур *A.thaliana* и *V.vinifera* с повышенным содержанием биологически активных вторичных метаболитов и устойчивостью к холоду;

предложен новый комплексный подход для получения камалексина и резвератрола с использованием клеточных культур с подавленной экспрессией генов семейства *JAZ*;

доказана возможность применения испытанного метода подавления экспрессии генов *JAZ* в биотехнологическом производстве фармакологически ценных веществ;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана роль транскрипционных факторов *JAZ* в регуляции продукции резвератрола и камалексина, а также придании устойчивости к холодовому воздействию;

применительно к проблематике диссертации результативно использованы методы культивирования клеток растений, создания генетических конструкций, биоинженерии растений, молекулярно-генетического анализа нуклеиновых кислот и экспрессии генов, биохимического анализа вторичных метаболитов, методы верификации устойчивости клеточных культур к абиотическим стрессовым фактора;

изложены основные результаты исследований, свидетельствующие о влиянии подавления экспрессии генов *JAZ* в клеточных культурах на продукцию вторичных метаболитов и устойчивость к холодовому воздействию;

раскрыта подавляющая функция AtJAZ1 и VvJAZ9 в реализации молекулярного механизма пути регуляции жасмоновой кислоты в части продукции вторичных метаболитов растений;

изучена взаимосвязь между уровнем экспрессии генов *JAZ* и экспрессией генов, участвующих в молекулярном механизме передачи сигнала жасмоновой кислоты, содержанием резвератрола и камалексина, а также устойчивостью культур к холодовому воздействию;

проведена модернизация процесса получения камалексина и резвератрола в трансгенных растениях путем ингибирования экспрессии генов *JAZ*;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждены тем, что:

разработаны и внедрены технологии получения камалексина и резвератрола существенно не влияющие на ростовые характеристики трансгенной культуры клеток растений в лабораторных условиях;

определены перспективы использования трансгенных культур клеток в качестве источника камалексина и резвератрола в биотехнологическом производстве;

создана модель эффективного получения резвератрола и камалексина в клеточных культурах растений;

представлено описание метода, основанного на природном механизме РНК-интерференции для получения клеточных культур продуцирующих резвератрол или камалексин;

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что для экспериментальных работ достоверность полученных результатов воспроизводилась в трех биологических повторах на контрольных и трансгенных культурах клеток. Эксперименты спланированы логично, были

использованы современные и актуальные методы исследования на приборной базе общемирового уровня;

теория, представленная соискателем, согласуется с принятой общемировой научной концепцией в данной области и в значительной мере развивает её;

идея базируется на анализе мировой литературы, посвященной гормональной регуляции жасмоновой кислоты, регуляции вторичного метаболизма растений в связи с абиотическими стрессами, используемой для повышения содержания, как вторичных метаболитов, так и повышения устойчивости клеточных культур;

использован анализ авторских данных и данных, полученных ранее по изучению устойчивости клеточных культур к абиотическим стрессам и регуляции биосинтеза вторичных метаболитов растений;

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах процесса исследования. Соискатель принимал участие в создании генетических конструкций, содержащих ген-предшественник искусственных микроРНК, получении трансгенных клеточных культур *Arabidopsis thaliana* и *Vitis vinifera*, их культивации, подтверждении наличия трансгена, анализе экспрессии генов при помощи метода ПЦР с детекцией результатов в реальном времени, экстракции вторичных метаболитов, анализе устойчивости к абиотическим стрессам, анализировал полученные данные статистически. Также соискатель лично участвовал в конференциях с целью апробации полученных результатов работы, написании и публикации работ.

Диссертационный совет пришел к выводу, что диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, которая соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения учёных степеней, п. 9, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1) Столь серьезное увеличение параметра продукции вторичных метаболитов влечёт за собой угнетение клеточного роста. Насколько жизнеспособными являются полученные клеточные линии с подавленной экспрессией генов семейства *JAZ*?

2) Какое количество генов *JAZ* охарактеризовано для винограда и арабидопсиса? Не исключено ли, что подавление большего спектра генов *JAZ* приведёт к более яркому эффекту на вторичный метаболизм и устойчивость?

3) Какие условия внешней среды необходимы для успешного применения продемонстрированной методики подавления генной экспрессии?

Соискатель Махазен Д.С. ответил на все вопросы, привел собственную аргументацию в ответах на вопросы дискуссионного характера и согласился с критическими замечаниями.

На заседании 26 апреля 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Махазену Д.С. ученую степень кандидата биологических наук за решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 15 докторов наук по специальности биотехнология, участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 16, против - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель
диссертационного совета,
академик РАН



Журавлев Юрий Николаевич

Ученый секретарь
диссертационного совета,

к.б.н.

Тюнин Алексей Петрович

27.04.2022 г.