

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, чл.-корр. РАН

ИНСТИТУТ
ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

им. К. А. Тимирязева
Российской академии наук

127276, Москва, И-276, Ботаническая ул., 35
Тел. (499) 678-54-00, Факс (499) 678-54-20
E-mail: ifr@ippras.ru



Д. А. Лось

« 8 » апреля 2022 г.

08.04.2022 г. № 12313/9311-154/22

На № от .

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук о диссертационной работе Махазена Дмитрия Сергеевича «Регуляция генов семейства *JAZ* посредством РНК-интерференции как инструмент активации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки).

Культура клеток и тканей растений – это генетически определённая популяция соматических клеток, штамм клеток, выращиваемый *in vitro*. В 30-е годы прошлого века Gautheret и Nobécourt во Франции и White в США независимо получили первые культуры растительных тканей на полностью синтетических средах. Совершенствование питательных сред, в том числе применение фитогормонов, позволило значительно расширить видовой и тканевой спектры эксплантов растений для культивирования *in vitro*.

В конце 50-х годов XX века список растений, ткани и клетки которых культивировали *in vitro*, был значительно пополнен и по данным классической монографии R. Gautheret 1959 года включал уже 142 вида. В 60-е годы XX века, да и в начале 80-х годов, ещё можно было следить за публикациями о новых культурах клеток растений и, безусловно, в пополнении списка тон задавали школы Р. Готре, Ф. Уайта, А. Хильдебрандта, Ф. Скуга, Х. Стрита, О. Гамборга, Р. Бутенко.

Уже в те годы был осознанный выбор растений для получения культивируемых клеток, связанный с их химическим составом, представляющих интерес для фармацевтики и других отраслей промышленности. Как правило, биологически активные вещества (БАВ) растительного происхождения являются продуктами вторичного метаболизма (вторичные соединения) и играют важнейшую роль в современной медицине. Их

использование часто ограничено доступностью растительных ресурсов и может представлять серьезную угрозу для редких и исчезающих видов лекарственных растений.

Радикальным решением проблемы возобновляемого ресурса ценных вторичных метаболитов является биотехнологический способ получения биомассы культур клеток высших растений, содержащей целевые БАВ. Тем не менее, к настоящему времени известны лишь десятки примеров коммерческого применения культуры клеток для производства БАВ. Основной причиной сложившейся ситуации является недостаточная продуктивность культур клеток по вторичным соединениям. Используя традиционные методы – селекцию продуктивных штаммов, оптимизацию сред, добавление химических предшественников синтеза – можно повысить продуктивность культур клеток растений.

Безусловно, свою лепту в решение проблемы должны внести генно-инженерные подходы, поскольку настройка экспрессии генов, определяющих синтез целевого продукта, может существенно изменить биосинтетические способности клеток *in vitro*. В связи с этим, диссертационная работа Махазена Д. С., посвящённая регуляции вторичного метаболизма в культуре клеток растений через модуляцию экспрессии генов *JAZ*, весьма актуальна и представляет большое теоретическое значение.

Цель диссертационной работы – оценить применимость механизма РНК-интерференции генов *JAZ*, супрессоров сигнального пути жасмонатов в решении проблемы повышения синтеза вторичных метаболитов культивируемыми клетками растений на примере культур клеток *Arabidopsis thaliana* и *Vitis vinifera*.

Следует сразу сказать, что поставленная цель достигнута, а полученные новые результаты и сделанные выводы имеют важное теоретическое и практическое значение. Впервые показано, что нарушение экспрессии гена *AtJAZ1* и его гомолога *VvJAZ9* в культурах клеток арабидопсиса и винограда, соответственно, значительно активирует синтез вторичных метаболитов без значительного негативного влияния на рост культур, что обеспечивает высокую продуктивность клеточных линий с РНК-интерференцией. Показана возможность влиять на устойчивость культур клеток к абиотическим стрессорам (холод, засоление) через модуляцию экспрессии генов *JAZ*. Полученные в работе результаты могут быть использованы в области биотехнологического производства фармакологически значимых соединений на основе культивируемых клеток растений.

Структура, объём и содержание диссертации. Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ. Материал диссертации изложен на 142 стр., которые включают 24 рисунка и 3 таблицы, и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (232 источника).

Во введении, автор обосновывает актуальность темы исследования, определяет его цели и задачи, формулирует положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы кратко изложены представления о культурах клеток растений, о вторичных метаболитах и регуляции их синтеза, подробно изложены сведения о сигнальном пути жасмонатов и роли белков супрессоров – *JAZ*. Рассматриваются во-

просы биоинженерной методологии (РНК-интерференция и агробактериальная трансформация), излагаются данные об объектах исследования и их вторичных метаболитах. Обзор литературы определённым образом демонстрирует эрудицию автора и желание показать актуальность диссертационной работы.

В методической главе даётся краткая информация о биоинформатическом анализе *JAZ*-генов, излагаются методы создания генетических конструкций и получения искусственной микроРНК (имиРНК) для прицельного нарушения экспрессии генов *AtJAZ1* и *VvJAZ9*. Описывается получение трансгенных культур клеток *A. thaliana* и *V. vinifera*, постановка экспериментов, молекулярно-генетический анализ экспрессии генов интереса и химический анализ вторичных метаболитов культивируемых клеток. **Работа выполнена с применением самых современных биотехнологических, молекулярно-биологических, физико-химических и аналитических методов и отражает высокий экспериментальный уровень диссертационной работы.**

Достоверность результатов основывается на применении современных методов оценки статистической достоверности полученных данных и корректной их интерпретации. Полученные выводы сделаны на основе достаточного числа биологических и аналитических повторностей.

Глава «Результаты и обсуждение» показывает, что Д. С. Махазену удалось убедительно продемонстрировать, что подавление экспрессии генов *AtJAZ1* и гена *VvJAZ9* посредством РНК-интерференции приводит к активации биосинтеза глюкозинолатов и камалексина в культуре клеток и *A. thaliana* (без ингибирования роста культуры) и *транс-резвератрола* в культуре клеток *V. vinifera* (с небольшим снижением индекса роста), соответственно. Кроме того, ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в культуре клеток арабидопсиса усиливает действия абиотических стрессоров на биосинтез камалексина и обеспечивает устойчивость этой культуры к холоду. Обнаруженный эффект является перспективным направлением для биоинженерного получения холодоустойчивых растений. Подавление экспрессии генов *JAZ* является перспективным генноинженерным инструментом активации биосинтеза вторичных метаболитов. Все полученные результаты обсуждены и подкреплены сопоставлением с ранее опубликованными данными других исследователей.

В разделе «Заключение» Дмитрий Сергеевич подводит итог проведённому исследованию и затем делает **обоснованные Выводы**.

Несмотря на общее, весьма положительное впечатление и несомненные достоинства, диссертация Д. С. Махазена не лишена некоторых недостатков.

Замечания.

Восприятию текста мешает нередко встречающееся несогласование слов в предложении и употребление странных слов, ненужных англицизмов и неуместных выражений. Например: ...активаторный эффект; ...таргетные гены; ... в пищевых, лечебных, культурных и косметических целях; хранение зародышевой плазмы; ... трихомов в листьях (прямо по Набокову!); рестрицировали ферментами; имеются данные о SNF1-связанной киназы 1 (SnRK1) (видимо об SNF1-подобной киназе!).

Многое из этого объясняется использованием не очень качественного перевода без последующего вдумчивого редактирования.

Кроме того, периодически белки JAZ неожиданно становятся факторами транскрипции, которыми они не являются (см. стр. 9, стр. 34). Диссертант часто считает синонимами фитоалексины и вторичные метаболиты и использует своеобразную классификацию для вторичных соединений. Утверждается (на стр. 10), что среди 13 изоформ семейства JAZ, именно JAZ1 играет ключевую роль в регуляции вторичного метаболизма (Song *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2018). Однако в этих статьях нет прямого указания на то, что JAZ1 играет ключевую роль в регуляции вторичного метаболизма. Утверждается, что абиотические и биотические стимулы активируют фосфолипазы в плазматической мембране, способствуя синтезу линоленовой кислоты в растении (стр. 27). Очевидно, способствуя высвобождению α -линоленовой кислоты!

Наконец, в списке литературы нет источников на русском языке, хотя работ, в том числе приоритетных, по культивируемым *in vitro* клеткам растений и вторичным соединениям в культурах клеток – очень много.

Вопросы.

1. Методология РНК-интерференции предполагает трансформацию клеток. Можно ли и каким образом модифицировать подход, чтобы избавиться от трансгеноза?
2. Насколько долго сохраняется эффект подавления экспрессии *AtJAZ1* и *VvJAZ9* в культурах клеток, в том числе без селективного давления канамицина?
3. Каковы будут последствия РНК-интерференции для нескольких генов JAZ?

Указанные замечания, в основном, носят дискуссионный характер и **не влияют на общую положительную оценку исследования, выполненного Д. С. Махазеным.**

Автореферат и опубликованные диссертантом работы отражают основные результаты исследования. Опубликовано 2 статьи в ведущих международных журналах из списка ВАК Минобрнауки РФ и одна статья в рецензируемом журнале из списка ВАК.

Диссертация Д. С. Махазена 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 при чтении курса лекций по физиологии и биотехнологии растений в ВУЗах Российской Федерации.

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.6 – «Биотехнология» (биологические науки), отвечает требованиям пунктов 9–14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями Постановлением Правительства Российской Федерации от 28 августа 2017 года №1024 «О внесении изменений в Положения о присуждении учёных степеней»), а её автор **Махазен Дмитрий**

Сергеевич заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – «Биотехнология» (биологические науки).

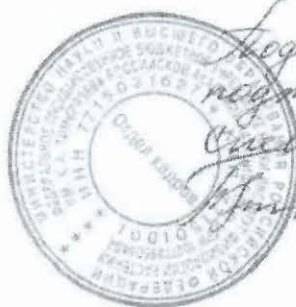
Отзыв подготовлен доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником Носовым А. В. и обсуждён на расширенном заседании лаборатории биологии культивируемых клеток Института физиологии растений. Итоги голосования: «за» – единогласно (протокол № 1 от 5 апреля 2022 г.).

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории биологии
культивируемых клеток ИФР РАН

А. В. Носов

Организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

127276, Москва, Ботаническая, 35; +7 (499) 678-54-00; +7 (499) 678-54-20;
ifr@ippras.ru



Александр Носов А. В.
подтверждено
Секретарь по кадрам
М.В. Бонникова

ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
Входящий № 24
« 11 » 04 2022 г.

Председателю диссертационного
Совета Д 99.0.064.02, созданного на
базе ФГБУН «Федеральный научный
центр биоразнообразия наземной биоты
Восточной Азии» ДВО РАН, академику
РАН, доктору биологических наук
Журавлеву Юрию Николаевичу
690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия
Владивостока, 159

СВЕДЕНИЯ о ведущей организации

по диссертационной работе Махазена Дмитрия Сергеевича на тему «Регуляция генов семейства *JAZ* посредством РНК-интерференции как инструмент активации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений» по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки) на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ИФР РАН
Адрес организации (с индексом)	127276, Москва, Ботаническая ул., 35
Официальный сайт организации	www.ippras.ru
Адрес электронной почты	ifr@ippras.ru
Сведения о профильном структурном подразделении	Лаборатория биологии культивируемых клеток
Составитель отзыва	Носов Александр Владимирович, доктор биологических наук (1.5.21.-физиология и биохимия растений), ведущий научный сотрудник
Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	<p>1. Glagoleva E.S., Konstantinova S.V., Kochkin D.V., Ossipov V., Titova M.V., Popova E.V., Nosov A.M., Paek, K.-Y. (2022) Predominance of oleanane-type ginsenoside R0 and malonyl esters of protopanaxadiol-type ginsenosides in the 20-year-old suspension cell culture of <i>Panax japonicus</i> CA Meyer. <i>Industrial Crops and Products</i>, 177, 114417.</p> <p>2. Popova E.V., Nosov A.V., Titova M.V., Kochkin D.V., Fomenkov A.A., Kulichenko I.E., Nosov A.M. (2021) Advanced Biotechnologies: Collections of Plant Cell Cultures As a Basis for Development and Production of Medicinal Preparations. <i>Russ J Plant Physiol</i> 68: 385–400.</p> <p>3. Titova M.V., Kochkin D.V., Sobolkova G.I., Fomenkov A.A., Sidorov R.A., Nosov A.M. (2021) Obtainment and Characterization of <i>Alhagi persarum</i> Boiss. et Buhse Callus Cell Cultures that Produce Isoflavonoids. <i>Appl Biochem Microbiol</i> 57: 20–30</p>

4. Kochkin D.V., Galishev B.A., Titova M.V., Popova E.V., Nosov A.M. (2021) Chromato-mass-spectrometric identification of glycosides of phenylethylamides of hydroxycinnamic acids in a suspension cell culture of mandragora turcomanica. *Russ J Plant Physiol*, 68(5):973–980.
5. Povydysh M.N., Titova M.V., Ivanov I.M., Klushin A.G., Kochkin D.V., Galishev B.A., Popova E.V., Ivkin D.Y., Luzhanin V.G., Krasnova M.V., Demakova N.V., Nosov A.M. Effect of phytopreparations based on bioreactor-grown cell biomass of *dioscorea deltoidea*, *tribulus terrestris* and *panax japonicus* on carbohydrate and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus. *Nutrients*, 13(11):3811, 2021
6. Titova M.V., Popova E.V., Shumilo N.A., Kulichenko I.E., Chernyak N.D., Ivanov I.M., Klushin A.G., Nosov A.M. (2021) Stability of cryopreserved polyscias filicifolia suspension cell culture during cultivation in laboratory and industrial bioreactors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 145:591–600.
7. Titova M.V., Popova E.V., Konstantinova S.V., Kochkin D.V., Ivanov I.M., Klyushin A.G., Titova E.G., Nebera E.A., Vasilevskaya E.R., Tolmacheva G.S., Kotenkova E.A., Nosov A.M., Paek K.-Y. (2021) Suspension cell culture of *dioscorea deltoidea*—a renewable source of biomass and furostanol glycosides for food and pharmaceutical industry. *Agronomy* (Basel), 11(2):394–394.
8. Zlobin I.E, Pashkovskiy P.P., Kartashov A.V., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Kuznetsov V.V. (2020) The relationship between cellular Zn status and regulation of Zn homeostasis genes in plant cells. *Environ Exp Bot* 176: 104104.
9. Lagunin A., Povydysh M., Ivkin D., Luzhanin V., Krasnova M., Okovityi S., Nosov A., Titova M., Tomilova S., Filimonov D., Poroikov V. (2020) Antihypoxic Action of *Panax japonicus*, *Tribulus terrestris* and *Dioscorea deltoidea* Cell Cultures: In Silico and Animal Studies. *Molecular Informatics*. 39(11), 2000093.
10. Novikova G.V., Stepanchenko N.S., Zorina A.A., Nosov A.V., Rakitin V.Y., Moshkov I.E., Los D.A. (2020) Coupling of Cell Division and Differentiation in *Arabidopsis thaliana* Cultured Cells with Interaction of Ethylene and ABA Signaling Pathways. *Life*. 10(2),15.
11. Orlova Y V., Sergienko O V., Khalilova LA, Voronkov AS, Fomenkov AA, Nosov A V., Popova LG, Shuvalov A V., Ryabova A V., Balnokin Y V. (2019) Sodium transport by endocytic vesicles in cultured *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cells. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 55: 359–370.
12. Sarvin B., Fedorova E., Shpigun O., Titova M., Nikitin M., Kochkin D., Rodin I., Stavrianidi A. (2018) Lc-ms determination of steroidal glycosides from *Dioscorea deltoidea* wall. cell suspension culture: Optimization of pre-lc-ms procedure parameters by latin square design. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1080:64–70.
13. Berestovoy M., Tyurin A., Kabardaeva K., Sidorchuk Y., Fomenkov A., Nosov A., Goldenkova-Pavlova I. (2018) Transient Gene Expression for the Characteristic Signal Sequences and the Estimation of the Localization of Target Protein in Plant Cell. *BIO-PROTOCOL* 8: 1–9.

14. Кочкин Д.В., Глаголева Е.С., Галишев Б.А., Спиридович Е.В., Носов А.М., Решетников В.Н. (2018) Анализ гинзенозидов в корнях женьшеня настоящего (*Panax ginseng*), интродуцированного в центральном ботаническом саду НАН Беларуси. Доклады Национальной академии наук Беларуси, том 62, № 4, с. 447–454.

15. Feduraev P.V., Mironov K.S., Gabrielyan D.A. Bedbenov V.S., Zorina A.A., Shumskaya M.A., Los D.A. (2018) Hydrogen peroxide participates in perception and transduction of cold stress signal in *Synechocystis*. *Plant Cell Physiol.* 59(6): 1255–1264.