

ОТЗЫВ

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

Актуальность исследования

Вторичные метаболиты растений являются важными биологически активными веществами и находят широкое применение в фармакологии и пищевой промышленности. Поиск растительных ресурсов для промышленного получения этих веществ представляет собой сложную научную и практическую задачу. Одним из способов решения данной проблемы является биотехнологический подход, основанный на культивировании клеточных культур растений-продуцентов. Основной проблемой в данном направлении является низкая продуктивность существующих в настоящий момент клеточных культур. Поэтому поиск способов повышения продукции вторичных метаболитов клетками растений в условиях культивирования представляет собой актуальную задачу. Диссертация Махазена Дмитрия Сергеевича представляет собой попытку решения данной проблемы. В этом смысле представленное диссертационное исследование представляется весьма актуальным.

Одним из путей решения данной проблемы является поиск универсальных и эффективных инструментов генетической инженерии растительной клетки, позволяющих управлять ее вторичным метаболизмом. Поиск таких инструментов осложняется тем, что при интенсификации синтеза вторичных метаболитов необходимо сохранить высокие ростовые характеристики получаемых трансгенных культур. В рамках диссертационного исследования Дмитрий Сергеевич предпринял удачную попытку снизить экспрессию регуляторных генов, продукты которых репрессируют пути биосинтеза вторичных метаболитов. Данный подход представляется перспективными, так как затрагивает регуляторные клеточные системы. Такое вмешательство может в итоге оказать более существенное и стойкое влияние на синтез вторичных метаболитов, чем классические попытки на основе сверхэкспрессии генов ферментов биосинтеза или транскрипционных факторов. В своей работе автор сосредоточился на генах сигнальной системы жасмоновой кислоты (ЖК) - супрессионных факторах транскрипции семейства JAZ. Исследование эффекта инактивации супрессоров семейства JAZ на биосинтез вторичных метаболитов была проведена методом, основанным на природном механизме РНК-интерференции.

Структура диссертационной работы

Диссертация Махазена Д. С. имеет классическую структуру, изложена на 142 страницах, содержит 24 рисунка и 3 таблицы. Список литературы насчитывает 232 наименования. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, главы «Результаты и обсуждение», выводов и списка литературы.

Во введении к представляемой работе Дмитрий Сергеевич формулирует тему исследования, демонстрирует ее актуальность, определяет цель и задачи. Целью представленной автором работы являлась оценка эффекта ингибирования экспрессии генов *JAZ* на вторичный метаболизм и продуктивность клеточных культур винограда и арабидопсиса, а также исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе этого эффекта. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить трансгенные клеточные культуры арабидопсиса и винограда, экспрессия гена *JAZ* в которых ингибирована посредством механизма РНК-интерференции.

2. Изучить эффект ингибирования экспрессии генов *JAZ* на продукцию азот-, серосодержащих соединений в культуре арабидопсиса и транс-резвератрола в культуре винограда. Оценить экспрессию генов ферментов биосинтеза и регуляторных ТФ.

3. Оценить активаторный эффект экзогенной ЖК, как имитации биотического стрессового стимула, на биосинтез и продуктивность фитоалексинов в нормальных и *JAZ*-ингибированных клеточных линиях.

4. Оценить активаторный эффект абиотических стрессовых стимулов (низкие температуры и засоление) на биосинтез и продуктивность фитоалексинов в нормальных и *JAZ*-ингибированных клеточных линиях.

5. Оценить экспрессию маркерных генов основных сигнальных систем растительной клетки (АБК, ЖК и АФК), для выявления их взаимодействия и участия в конститутивной активации ЖК-сигнальной системы, опосредованной ингибированием экспрессии гена *JAZ*.

Поставленные задачи полностью соответствуют теме исследования и удачно раскрывают ее суть.

В главе «Обзор литературы» автор подробно освещает современное состояние представлений о системах гормональной регуляции у растений, их влиянии на синтез вторичных метаболитов и возможностях управления этими процессами. Особое внимание уделено сигнальному пути жасмоновой кислоты, а также взаимодействию данного пути с другими гормональными системами. Автор излагает современные данные о методе ингибирования экспрессии генов посредством механизма, основанном на природной РНК-интерференции.

Описывает возможность применения этого метода для активации синтеза вторичных метаболитов растений.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методы получения и анализа трансгенных клеточных культур. В ходе работы были использованы современные методы получения генетических конструкций и трансгенных культур. Для количественного анализа вторичных метаболитов был использован высоконадежный метод ВЭЖХ. Для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе стимуляции синтеза вторичных метаболитов, автором был применен метод полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени. Данный метод незаменим для анализа уровня экспрессии различных генов. Статистическая обработка данных произведена методами Т-статистики, широко используемым для биологических работ. Используемые автором методы адекватны поставленным задачам, высокоинформативны, надежны, обеспечивают высокий методический уровень выполнения работы.

Глава «Результаты и обсуждение» включает в себя изложение полученных экспериментальных данных, и их анализ в рамках современных представлений о механизмах гормональной регуляции у растений. Основные представленные результаты включают в себя анализ генетической информации с использованием высокоэффективного биоинформационного подхода и моделирование рекомбинантной конструкции *in silico*, а затем сборка этой конструкции *in vitro*. На следующем этапе были получены трансгенные клеточные культуры, трансформированные полученными автором конструкциями. Далее Дмитрий Сергеевич приводит результаты исследования ростовых характеристик и продукции вторичных метаболитов трансформированными культурами в контрольных и в стрессовых условиях. Последняя часть главы посвящена анализу молекулярного механизма действия ингибирования генов JAZ1 и JAZ9 на ростовые свойства и продукцию вторичных метаболитов. Изучение механизма представлено не только анализом экспрессии генов, связанных с сигнальными путями жасмоновой кислоты и абсцизовой кислоты. Автор предпринял попытку объединить и обсудить взаимодействие различных сигнальных систем, привести полученные результаты в одну общую картину.

Таким образом представленная диссертационная работа является целостным исследованием демонстрирующим все этапы работ от формулирования идеи до анализа физиологического ответа, что вызывает глубокое удовлетворение.

Результаты работы представлены на двух конференциях, по теме диссертации опубликовано две статьи в журналах входящих в базы WoS/Scopus и список ВАК (журналы Journal of Biotechnology, Plant cell tissue and organ

cultures). Данные журналы являются ведущими в области биотехнологии и культур клеток.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов

Научная новизна представленной работы заключается в том, что была впервые показана активация биосинтеза вторичных метаболитов (камалексина в клеточных культурах арабидопсиса и *транс*-резвератрола в культурах винограда) в которых ингибированы гены *JAZ1* и *JAZ9* соответственно. Также впервые была показан молекулярный механизм ответственный за данные явления.

Полученные результаты могут быть использованы для получения клеточных культур - эффективных продуцентов различных вторичных метаболитов, так как полученный эффект активации был показан на растениях реализующих разные биосинтетические пути. Незначительное снижение ростовых характеристик клеточных культур при ингибировании генов *JAZ1* и *JAZ9* повышает практическую ценность полученных результатов. Отдельный практический и научный интерес представляет увеличение толерантности трансгенных культур к холодovому стрессу, что открывает возможности для получения холодоустойчивых сортов культурных растений, особенно актуальных для отечественного сельского хозяйства.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертационной работы

При выполнении работы Дмитриев Сергеевичем были использованы современные, высокоинформативные методы молекулярно-биологических и биохимических исследований. Использованные методы адекватны поставленным задачам, протоколы методик подробно описаны в разделе «Материалы и методы». Совокупность выбранных автором методов и статистическая обработка данных обеспечивают достоверность и обоснованность полученных результатов. Приведенные автором результаты опубликованы в ведущих рецензируемых журналах по биотехнологии и молекулярной биологии растений, апробированы на конференциях. В следствии этого, полученные данные не вызывают сомнений. Сделанные автором выводы обоснованы, соответствуют полученным данным и логично вытекают из них. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

В ходе чтения к диссертационной работе возникли следующие вопросы:

1. Уровень гомологии генов *JAZ1* из *A.thaliana* и *JAZ9* из *V. vinifera* относительно невысок - 47%. Насколько корректно сравнение функций двух генов при таком уровне гомологии?

2. Почему при получении трансгенных культур *A.thaliana* не было получено культуры, трансформированной «пустым вектором» не содержащим последовательности имиРНК, как это было сделано для *V. vinifera*?

Также к работе имеется несколько замечаний:

1. Среди положений, выносимых на защиту, положение №5 является, на мой взгляд, лишним. Во-первых: количество положений выносимых на защиту вполне можно ограничить четырьмя. Во-вторых: судить об универсальности предложенного подхода с использованием РНК-интерференции на основании исследования двух видов растений, несколько преждевременно. Однако не могу не согласиться с автором что такой поход выглядит привлекательным и многообещающим.

2. Было бы интересно реконструировать целые растения из полученных автором трансгенных культур, чтобы понять, можно ли использовать устойчивость к холодовому стрессу, обнаруженную на каллусах, в практическом растениеводстве. Выражаю надежду, что такой эксперимент в дальнейшем будет поставлен. Получение холодоустойчивых и высокопродуктивных сортов культурных растений является весьма актуальной практической задачей, особенно для России. На мой взгляд, обнаруженная автором холодоустойчивость представляет едва ли не больший практический интерес, чем интенсификация синтеза резвератрола, ради которой исследование начиналось.

В тексте работы можно отметить наличие небольших стилистических недостатков во введении, изложении и обсуждении полученных результатов.

Изложенные замечания не умаляют достоинств работы Махазена Д.С. и не в коей мере не могут препятствовать присуждению автору ученой степени кандидата биологических наук.

Заключение

Диссертационное исследование, проведенное Махазеным Д. С. «Регуляция генов семейства *JAZ* посредством РНК-интерференции как инструмент активации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений», представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, в которой представлены данные об активации вторичного метаболизма при помощи ингибирования генов семейства *JAZ* у растений, исследован молекулярный механизм данного явления и предпринята попытка оценить дальнейшие перспективы применения метода ингибирования генов *JAZ* в биотехнологии растений. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. Актуальность темы, достоверность полученных результатов, обоснованность

сделанных выводов, теоретическая и практическая значимость результатов диссертационной работы соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 с изм. от 26.05.2020), а её автор Махазен Дмитрий Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки).

Кандидат биологических наук,
по специальностям
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии),
03.01.04 – биохимия,
Доцент кафедры биохимии и биотехнологии,
Института мирового океана
mazyka.an@dvfu.ru

Мазейка
08.04.2022

Мазейка Андрей Николаевич



Федеральное Государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования «Дальневосточный федеральный
университет»; ДВФУ
690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10

ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
Входящий № 27
« 11 » апреля 20 22 г.

СВЕДЕНИЯ об официальном оппоненте

По диссертации Махазена Д. С. 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.

Фамилия, Имя, Отчество официального оппонента	Мазейка Андрей Николаевич
Ученая степень, наименование научной специальности и отрасли науки, по которым защищена диссертация; ученое звание (при наличии)	Кандидат биологических наук, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) 03.01.04 - биохимия
Полное и сокращенное наименование организации в соответствии с Уставом, являющейся основным местом работы	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»; ДВФУ
Структурное подразделение, должность	Институт мирового океана, Кафедра биохимии и биотехнологии, доцент
Почтовый индекс, адрес организации	690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10
Веб-сайт	https://www.dvfu.ru/schools/school_of_natural_sciences/structures/department/the-cluster-of-biological-departments/department-of-biochemistry-microbiology-and-biotechnology/members/mazeyka-andrey-nikolaevich/
Телефон	914 071 30 38
Адрес электронной почты	mazeyka.an@dvfu.ru
Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	
1. Chopenko N., Golotin V., Pomazenkova L., A. Mazeika A., Leonova G., Kostetsky E., Sanina N. Chimeric protein joining E protein domain III of tick-borne encephalitis virus and OmpF porin of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> as the antigen of TI-complexes. FEBS Open Bio. 2019; 9 (Suppl. 1): 378. doi: 10.1002/2211-5463.12675.	
2. N. Sanina, N. Chopenko, A. Mazeika, L. Davydova, G. Leonova, A. Stenkova, V. N. Uversky, E. Kostetsky. Immunogenicity and Protective Activity of a Chimeric Protein Based on the Domain III of the Tick-Borne Encephalitis Virus E Protein and the OmpF Porin of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Incorporated into the TI-Complex. // Int. J. Mol. Sci. 2018, 19(10), 2988; doi:10.3390/ijms19102988	
3. V. Golotin, N. Sanina, L. Davydova, N. Chopenko, A. Mazeika, M. Roig, V. Shnyrov, V. N.	

Uversky, E. Kostetsky. Recombinant Fusion Protein Joining E Protein Domain III of Tick-Borne Encephalitis Virus and HSP70 of *Yersinia pseudotuberculosis* as an Antigen for the TI-Complexes // *Biomolecules* 2018, 8, 82; doi:10.3390/biom8030082 IF 4.694, Q1 (2016-2018)

4. A.M. Stenkova, N.S. Chopenko, L.A. Davydova, A.N. Mazeika, E.P. Bystritskaya, O.Y. Portnyagina, S.D. Anastyuk, D.S. Kulbatskii, E.N. Lyukmanova, D.A. Dolgikh, G.N. Leonova, E.Y. Kostetsky, N.M. Sanina. Expression, immunogenicity and protective activity of chimeric protein based on E protein domain III of tick-borne encephalitis virus and OmpF porin of *Yersinia pseudotuberculosis*// *The FEBS Journal*, Vol 284, Supplement 1, September 2017, P 375

5. Nina Sanina, Natalia Chopenko, Andrey Mazeika, and Eduard Kostetsky. Nanoparticulate Tubular Immunostimulating Complexes: Novel Formulation of Effective Adjuvants and Antigen Delivery Systems // *BioMed Research International* Volume 2017 (2017), Article ID 4389525, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2017/4389525> IF 2.587

6. Stenkova A.M., Chopenko N.S., Davydova L.A., Mazeika A.N., Bystritskaya E.P., Portnyagina O.Y., Anastyuk S.D., Kulbatskii D.S., Lyukmanova E.N., Dolgikh D.A., Kostetsky E.Y., Sanina N.M."Engineering Of Chimeric Protein Based On E Protein Domain III Of Tick- Borne Encephalitis Virus And OmpF Porin Of *Yersinia Pseudotuberculosis*" *Protein Pept Lett.* . 2017; V.24 №10 pp. 974-981. doi: 10.2174/0929866524666170724151917 IF 1.168

7. Toxicity and immunogenicity investigation of Tick-borne encephalitis virus chimeric antigen incorporated in immunostimulating complexes based on triterpene glycosides from *Cucumaria japonica* Andrey Mazeyka, Ludmila Pomazenkova, Nina Sanina, Ekaterina Krasheninina *Marine Biology in the 21st Century: Achievements and Development Prospects (on the 100th Anniversary of Birth of the Academician Alexei V. Zhirmunsky)*. October 6–8, 2021, Vladivostok, Russia A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciencesб Primorsky Aquarium–Branch of the NSCMB FEB RAS Book of abstracts pp 128-130

8. Мазейка А.Н., Помазенкова Л.А., Санина Н.М., Чепрунова А.В., Чопенко Н.С. Влияние гликолипидной составляющей ТИ-комплексов на иммуногенность химерного белка OMPF-(EIII)₂, включающего последовательности OMPF gjhbyf *Yersinia Pseudotuberculosis* и двух повторов третьего домена белка E вируса клещевого энцефалита. Материалы региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов молодых ученых по естественным наукам, Владивосток, 11-22 мая 2020 года. с.159-1260. научное электронное издание

9. Chopenko N, Mazeika A, Davydova L, Stenkova A, Leonova G, Kostetsky E, Sanina N Effectivity of nanovaccine against tick-borne encephalitis *METANANO – 2018*, 17 - 21 September 2018 Sochi, Russia *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series* 1092 (2018) 012020 doi :10.1088/1742-6596/1092/1/012020

10. The influence of different cucumariosides on immunogenicity of OmpF porin from *Yersinia pseudotuberculosis* as a model protein antigen of tubular immunostimulating complex N. M. Sanina, N. S. Chopenko, L. A. Davydova, A. N. Mazeika, O. Yu. Portnyagina more... *AIP Conference Proceedings* 1874, 040029 (2017); <http://doi.org/10.1063/1.4998102>

11. Sanina N.M., Chopenko N.S., Davydova L.A., Mazeika A.N., Portnyagina O.Yu., Kim N.Yu.,
Golotin V.A., Kostetsky E.Y., Shnyrov V.L.
The Influence of Different Cucumariosides on Immunogenicity of OmpF Porin from *Yersinia*
Pseudotuberculosis as a Model Protein Antigen of Tubular Immunostimulating Complex
METANANO – 2017, 18 - 22 September, 2017, Vladivostok, Russia Sep 14, 2017