

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук Ермаковой Светланы Павловны на диссертацию Махазена Дмитрия Сергеевича «Регуляция генов семейства JAZ посредством РНК-интерференции как инструмент активации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология (биологические науки)

Актуальность темы диссертации. Глобальная мировая задача – сохранение биологического разнообразия – решается на стыке биотехнологии, биоинженерии и охраны дикой природы. Растениеводческие биотехнологии отличаются широким набором объектов и направлены на получение новых форм растений и облегчение селекционного процесса, на эффективное размножение и оздоровление ценных генотипов. Одним из направлений биотехнологии растений является получение ценных метаболитов растительного происхождения на основе клеточных культур-продуцентов, поскольку использование растений и синтезируемых ими биологически активных веществ в современной медицине значительно возрастает. Основной проблемой в данном направлении является низкая продуктивность клеточных культур многих видов растений. Поэтому регуляция синтеза фармакологически значимых фитоалексинов и изучение сопутствующих молекулярных механизмов, представляет несомненный научный интерес.

Диссертационная работа Д.С. Махазена, посвященная изучению разнообразия JAZ генов в клеточных культурах арабидопсиса и винограда и исследованию роли этих генов на процесс биосинтеза фенилпропаноидных производных и азот-, серосодержащих соединений, обладающих фармакологическими свойствами, является важной и актуальной как с фундаментальной, так и с практической стороны.

Новизна научного исследования заключается в определении роли гена JAZ1 и его гомолога на биосинтез вторичных метаболитов в клеточных культурах растений винограда и арабидопсиса.

Научно-практическая значимость представленных результатов очевидна: полученные в работе данные могут быть использованы в биотехнологических целях. Также на основе представленных методов могут быть разработаны методические пособия для проведения теоретических и практических занятий в университете на биологических факультетах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ингибирование экспрессии генов AtJAZ1 и VvJAZ9 посредством РНК-интерференции в клеточных культурах *A. thaliana* и *V. vinifera*, приводит к активации

биосинтеза камалексина и транс-резвератрола соответственно.

2. Ингибирование экспрессии генов AtJAZ1 и его гомолога VvJAZ9 в клеточных культурах арабидопсиса и винограда соответственно имитирует действие сигнальной системы ЖК, что обеспечивает активацию биосинтеза фитоалексинов без значительного ингибирования роста, характерного для природного ЖК-опосредованного ответа.

3. Ингибирование экспрессии гена AtJAZ1 в клетках арабидопсиса усиливает активаторные действия абиотических стрессов (соль, холод) на биосинтез камалексина, а также обеспечивает устойчивость клеточной культуры к холодовому стрессу, что способствует увеличению продуктивности камалексина за счет слабого ингибирующего действия низких температур на рост трансгенной культуры по сравнению с контрольной.

4. Ингибирование экспрессии гена AtJAZ1 изменяет конститутивную и индуцибельную экспрессию ключевых генов ответа на стрессовые воздействия: ICE1, MYC2, ZAT12, группы генов DREB, HSF, ABF, что обеспечивает увеличение продуктивности трансгенной культуры при воздействии холода за счёт активации вторичного метаболизма и снижения отрицательного воздействия холода на рост культуры через взаимодействие сигнальных путей АБК, ЖК и АФК.

5. Ингибирование экспрессии генов JAZ является перспективным универсальным биотехнологическим инструментом для активации биосинтеза фенилпропаноидных производных и азот-, серосодержащих соединений, обладающих фармакологическими свойствами, с целью получения рентабельных альтернативных источников на основе высокопродуктивных клеточных культур растений.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций, заключений подтверждается большим количеством экспериментов с подробным описанием методов исследования (биоинформатический анализ, создание генетических конструкций, получение и культивирование клеточных линий, молекулярно-генетические анализы, химический анализ вторичных метаболитов клеточных культур), используемых в работе.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Махазена Д.С. изложена на 142 страницах печатного текста и включает 24 рисунка и 3 таблицы. Научно-квалификационная работа, отражающая результаты научных исследований автора и представленная на соискание ученой степени в виде рукописи и автореферат, оформлены в соответствии с ГОСТ 3 7.0.11-2011. Диссертация включает: титульный лист; оглавление (стр. 2), список сокращений и условных обозначений (стр. 6) и текст диссертации: введение (стр. 8-15), основную часть, состоящую из обзора литературы (стр. 15-61),

экспериментальной части и полученных результатов (стр. 61-111), заключения (стр. 111), и списка литературы (стр. 116-142). Список литературы включает 232 наименования отечественных и зарубежных источников, из которых около 25 % опубликованы за последние 5 лет. Содержание литературного обзора отражает содержание экспериментальной части. Литературные данные проанализированы и увязаны с задачами проведения эксперимента.

Работа оформлена аккуратно. Рисунки и таблицы отражают полученные экспериментальные данные. Следует отметить, что автор грамотно комбинирует на рисунках полученные данные, что значительно облегчает восприятие массива данных.

Целью представленной работы была оценка эффекта ингибирования экспрессии генов *JAZ* на вторичный метаболизм и продуктивность клеточных культур винограда и арабидопсиса, а также исследование молекулярных механизмов данных процессов. Поэтому в литературном обзоре автор приводит информацию о клеточных культурах растений как альтернативном источнике вторичных метаболитов. Автор приводит описание таких соединения таких соединений как таксол и винкристин так как данные соединения относят к смежной группе вторичных метаболитов - терпеноидсодержащих алкалоидов.

Иногда автор использует тривиальные названия, что приводит к потере значения излагаемого материала. «Пример фитоантиципина – глюкозинолаты растений и другие метаболиты, содержащие остаток сахара и биологически активную функциональную группу, связь между которыми разрывается бетаглюкозидазой в опасный для растения момент...». Правильнее было бы сказать: «Пример фитоантиципина – глюкозинолаты растений и другие метаболиты, содержащие остаток глюкозы и биологически активную функциональную группу, связь между которыми разрывается бета-глюкозидазой в опасный для растения момент...».

В литературном обзоре подробно описана РНК-интерференция как инструмент биоинженерии растений, затем следует описание вторичных метаболитов объекта исследования - арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и фармакологических свойств азот-, серосодержащих метаболитов арабидопсиса. Логичным является описание вторичных метаболитов винограда (*Vitis vinifera*) и фармакологических свойств резвератрола и других вторичных метаболитов винограда. Однако отсутствие обобщающих фраз по изложенному материалу делает переход от литературного обзора к методам, которые автор использует в работе, несколько резким.

В экспериментальной части диссертацией подробно описаны методы и подходы,

которые авторы применяет для решения поставленных задач.

Для поиска среди известных генов JAZ винограда ближайшего гомолога гена JAZ1 арабидопсиса автором был проведен филогенетический анализ генов группы JAZ в этих растениях. Следующим шагом были анализ гена AtJAZ1 арабидопсиса и гена VvJAZ9 винограда и анализ белок-белковых взаимодействий AtJAZ1. Для изучения роли этих генов были получены генетические конструкции и трансгенные культуры клеток арабидопсиса и винограда. Ингибирование целевых генов в полученных культурах по сравнению с контрольными было подтверждено методом ПЦР-РВ. Содержание вторичных метаболитов в клеточных культурах арабидопсиса и винограда было изучено с применением различных физико-химических методов исследования. Установлено, что ингибирование экспрессии гена AtJAZ1 приводит к увеличению содержания целевого продукта - камалексина, не замедляет рост культуры, что имеет немаловажное значение в биоинженерии растений. Анализ эффекта ингибирования экспрессии гена VvJAZ9 на биосинтетические показатели в культуре клеток винограда показал, что почти 5-ти кратное снижение экспрессии гена VvJAZ9 приводит к активации биосинтеза резвератрола в 10 раз, но при этом наблюдается негативное влияние на ростовые характеристики трансгенной культуры. Следующим этапом было исследование действия метилжасмоната на экспрессию генов AtJAZ1 и VvJAZ9 в клетках арабидопсиса и винограда и влияние абиотических стрессовых воздействий, таких как холод и соль, на рост клеточных линий арабидопсиса и продукцию камалексина. В ходе проведения многоплановых исследований было установлено, что

ингибирование экспрессии гена AtJAZ1 посредством РНК-интерференции в клеточной культуре *A. thaliana* приводит к активации биосинтеза азот-, серосодержащих соединений, не ингибируя накопление биомассы трансгенной культуры;

ингибирование экспрессии гена VvJAZ9 (ближайшего гомолога гена AtJAZ1 арабидопсиса) в клеточной культуре *V. vinifera* приводит к увеличению содержания транс-резвератрола;

ингибирование экспрессии гена AtJAZ1 в клеточной культуре арабидопсиса усиливает активаторные действия абиотических стрессов (соль, холод) на биосинтез камалексина;

ингибирование экспрессии гена AtJAZ1 изменяет конститутивную и индуцибельную экспрессию ключевых генов ответа на стрессовые воздействия: ICE1, MYC2, ZAT12, группы генов DREB, HSF, ABF.

При ознакомлении с представленными **результатами** возникли следующие вопросы

и замечания.

1. Стр. 79 рис. 9. В описании к рисунку 9 «Синим выделены белки, желтыми линиями и зеленой линией отмечены взаимодействия, AtJAZ1 выделен коричневым и показан в центре».

В чем разница взаимодействий, отмеченных зеленой и желтыми линиями? В тексте диссертации отсутствуют пояснения.

2. Автором для исследований были получены генетические конструкции и трансгенные клеточные культуры арабидопсиса и винограда. Почему для арабидопсиса не получена трансгенная культура с пустым вектором, как для культуры с виноградом? Далее автор упоминает, что «...ранее было показано, что агробактериальная трансформация клеточной культуры пустым вектором не оказывает влияния на биосинтез камалексина и ИГ (Vulgakov et al., 2016)». Однако для чистоты эксперимента следовало бы получить и привести собственные данные в подтверждение полученных ранее результатов.

3. Для рис. 16 на стр 89. Несоответствие единиц в описании по тексту и данных рисунка, вероятно, это опечатка: «...камалексин, в контрольной культуре отсутствовал, его возможная концентрация была ниже предела обнаружения детектором хроматографа; однако в трансгенной культуре его концентрация составила 0,045 мкМ/мг сухого веса (Рисунок 16).» На рис мкМ/г СВ

4. Стр 91, рис. 17. «...спектры полного сканирования (справа, сверху) и спектры ионов-продуктов. Ионы-предшественники $[M+H]^+$ при m/z 201 (справа, внизу) были получены в режиме положительных ионов...». Путаница при идентификации спектров, где справа, внизу?

5. В работе много англоязычных терминов, что обусловлено использованием международных источников литературы. Автор приводит расшифровку ряда сокращений, но по тексту иногда попадаются «гибриды». Например, COI1-ЖК-Иле-JAZ. В тексте англоязычные и русские термины, описывающие один и тот же процесс, встречаются рядом и из-за этого несколько нарушается общая целостность изложения.

Например, на стр. 70. «Выделение тотальной РНК из ткани каллусов было выполнено методом преципитации LiCl, как показано ранее..»

Строкой ниже фраза: «...Полученную суммарную РНК...»

Вероятно, можно было использовать вместо тотальной РНК – суммарная РНК, вместо преципитации – осаждение.

6. Наречие «соответственно» в предложении не выделяется запятыми. В диссертации

встречаются варианты и с запятыми и без запятых. Следует отметить, что количество опечаток в диссертации незначительное.

Общая характеристика диссертационной работы.

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают научной ценности и практической значимости работы, выполненной диссертантом Махазеном Д.С. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в 2 статьях в рецензируемых международных и 1 статье в российском журнале из списка ВАК и 2 тезисах докладов в материалах научных конференций: Международная научно-практическая конференция «Вопросы современных научных исследований» (Москва, 2019) и XVI Всероссийская молодёжная школа-конференция памяти В.Е. Васьковского (Владивосток, 2017).

Принципиальных замечаний по представленной диссертации и качеству оформления нет.

Заключение. Считаю, что диссертационная работа Махазена Дмитрия Сергеевича «Регуляция генов семейства JAZ посредством РНК-интерференции как инструмент активации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология (биологические науки) по своей актуальности, объему и качеству, научной и практической значимости соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции от 01.10.2018 г), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор достоин присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук.

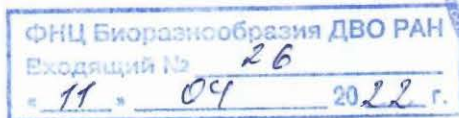
Ермакова Светлана Павловна
Доктор химических наук
по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия,
доцент, заведующая лабораторией химии ферментов
ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии
им Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской
академии наук
11.04.2022 г.
690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостока, д.
159, тел. +79147252424, e-mail:swetlana_e@mail.ru

 /Ермакова С.П./

Подпись Ермаковой С.П. подтверждаю
Ученый секретарь ТИБОХ ДВО РАН
К.х.н. Куриленко В.В.
11 апреля 2022 года



 /Куриленко В.В./



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) представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Фамилия, Имя, Отчество официального оппонента	Ермакова Светлана Павловна
Ученая степень, наименование научной специальности и отрасли науки, по которым защищена диссертация; ученое звание (при наличии)	Доктор химических наук 02.00.10 – биорганическая химия Доцент по специальности «Биорганическая химия»
Полное и сокращенное наименование организации в соответствии с Уставом, являющейся основным местом работы	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, ТИБОХ ДВО РАН
Структурное подразделение, должность	Лаборатория химии ферментов, заведующая лабораторией
Почтовый индекс, адрес организации	690022, Владивосток, Проспект 100 лет Владивостоку, 159/2 факс: (423) 231-40-50 Приёмная директора: (423) 231-14-30 эл. почта: office@piboc.dvo.ru http://www.piboc.dvo.ru/
Веб-сайт	http://www.piboc.dvo.ru/structure/ext_labs/lab1.php
Телефон рабочий	(423)2310705
Адрес электронной почты	swetlana_e@mail.ru
Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Silchenko A. S., Rasin A. B., Zueva A. O., Kusaykin M. I., Zvyagintseva T. N., Rubtsov N. K., Ermakova S. P. Discovery of a fucoidan endo-4O-sulfatase: Regioselective 4O-desulfation of fucoidans and its effect on anticancer activity <i>in vitro</i> // Carbohydrate Polymers. – 2021. – Vol. 271. – P. 118449. – https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118449. 2. Zueva A. O., Silchenko A. S., Rasin A. B., Kusaykin M. I., Usoltseva R. V., Kalinovsky A. I., Kurilenko V. V., Zvyagintseva T. N., Thinh P. D., Ermakova S. P. Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanases from the marine bacterium <i>Wenyinzhuangia fucanilytica</i> CZ1127T // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 3025-3037. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.131. 3. Malyarenko O. S., Usoltseva R. V., Silchenko A. S., Ermakova S. P. Aminated laminaran from brown alga <i>Saccharina cichorioides</i>: Synthesis, structure, anticancer, and radiosensitizing potential <i>in vitro</i> // Carbohydrate Polymers. – 2020 – Vol. 250. P. 117007-117017. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117007. 	

4. Malyarenko O. S., Usoltseva R. V., Zvyagintseva T. N., **Ermakova S. P.** Laminaran from brown alga *Dictyota dichotoma* and its sulfated derivative as radioprotectors and radiosensitizers in melanoma therapy // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – Vol. 206. – P. 539–547. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.008>.
5. Silchenko A. S., Rasin A. B., Kusaykin M. I., Malyarenko O. S., Shevchenko N. M., Zueva A. O., Kalinovsky A. I., Zvyagintseva T. N., **Ermakova S. P.** Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae* // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – Vol. 193. – P. 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.04>.
6. Silchenko A. S., Rasin A. B., Kusaykin M. I., Kalinovsky A. I., Miansong Zh., Changheng L., Malyarenko O. S., Zueva A. O., Zvyagintseva T. N., **Ermakova S. P.** Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri* // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – Vol. 175. – P. 654– 660. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.043>.