



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

16.03.2016 № 401/1-217.1-243

на № _____ от _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБХ РАН
академик Иванов В.Т.
16 марта 2016 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о теоретической и практической ценности диссертационной работы Поздышева Дениса Валерьевича «Участие генов, индуцируемых метанолом, в росте и устойчивости растений к стрессу», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность работы.

На сегодняшний день известно, что растения синтезируют метанол, причем наиболее высокий уровень синтеза наблюдается при активном вегетативном росте или при стрессовом воздействии на растение. Метанол рассматривается как побочный продукт модификации клеточной стенки ферментом пектинметилэстеразой. При этом существуют примеры летучих органических соединений с сопоставимым уровнем синтеза, для которых показано участие в регуляции реакции растений на стресс. Это дало основание предполагать наличие подобной функции и для метанола. В литературе описаны доказательства участия метанола в ответе растений на атаку насекомых-фитотофагов, однако механизмы такого участия плохо изучены.

Диссертационная работа Поздышева Дениса Валерьевича посвящена изучению реакции растительной клетки на повышенные концентрации метанола на транскрипционном, клеточном и физиологическом уровне, что представляет собой весьма актуальное направление исследований в области молекулярной биологии растений.

Научная новизна работы, степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Основной целью представленной диссертационной работы является изучение участия генов, уровень мРНК которых возрастает при обработке растений метанолом

(ГИМ – генов, индуцированных метанолом) в росте и стрессовых реакциях растений. Для достижения цели были решены 3 задачи, позволившие впервые описать изменения в экспрессии генома растительной клетки в ответ на повышенный уровень газообразного метанола в физиологических концентрациях. Впервые идентифицированы гены, чувствительные к метанолу, также был изолирован промотор, индуцируемый метанолом. ГИМ были найдены и среди генов, значимых для развития листа. Впервые показано влияние ГИМ на регуляцию плазмодесмального транспорта, а также на чувствительность растения к вирусной инфекции, предложены механизмы такого влияния. Впервые была предложена схема регуляции гена, основанная на принципе обратной связи с участием метанола.

В работе получены доказательства в поддержку функциональной роли метанола как регулятора иммунных реакций. Предложена теоретическая схема обратной негативной регуляции ГИМ, универсальность которой может способствовать решению других задач в области молекулярной биологии растений. В практическом плане изолированные последовательности промоторов генов растений, один из которых индуцируется метанолом, могут быть использованы в биотехнологии.

Диссертационная работа Поздышева Д.В. построена по традиционному плану и состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов, раздела, посвященного экспериментальным результатам и их обсуждению, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Результаты, полученные в соавторстве, отмечены в описании рисунков и таблиц. Работа изложена на 106 страницах машинописного текста и включает 34 рисунка и 6 таблиц.

Во введении автор приводит данные о существующих исследованиях, посвященных изучению влияния метанола на растительную клетку и обосновывает актуальность выбранной темы исследования. Обзор литературы четко структурирован и включает в себя 9 разделов. Первые четыре посвящены описанию и особенностям функционирования пектинметилэстераз (ПМЭ) в растении. Здесь автор рассматривает роль ПМЭ не только в процессе роста и развития растения, но и в стрессовых условиях. В последующих разделах собраны основные данные, касающиеся эмиссии метанола растением в нормальных условиях, а также метаболизму метанола. Далее автор останавливается на имеющихся в литературе данных относительно эмиссии метанола в условиях стресса, а также представляет краткое описание других летучих органических соединений. Обзор полностью отражает современное состояние проблемы, написан хорошим научным языком и представляется достаточно целостным и глубоким.

В разделе «Материалы и методы» описаны молекулярно-биологические и аналитические подходы, используемые автором в исследованиях. На некоторых методиках автор останавливается подробно, а для других даны соответствующие ссылки,

в том числе на протоколы производителя. В целом, экспериментальная часть выполнена на высоком уровне с использованием актуальных методов и современной приборной базы. Эксперименты описаны достаточно подробно и могут быть воспроизведены согласно приведенным протоколам.

Раздел «Результаты и обсуждение», в котором изложены и интерпретированы основные данные, полученные в ходе исследования, разбит на три главы. В первой главе проверяется утверждение о связи синтеза метанола с активностью пектинметилэстеразы при механической травме листа для используемой экспериментальной системы – растений рода *Nicotiana*. С помощью нозерн-блот анализа показано, что повреждение листьев абразивным материалом приводит к накоплению мРНК ПМЭ, сопровождаемому повышением ферментативной активности ПМЭ в клетке. Механическая травма листьев влечет за собой рост концентрации метанола в соке, а также повышение уровня газообразного метанола, эмитируемого листьями. Определен набор генов, экспрессия которых повышается в ответ на воздействие газообразного метанола на растение. Как метанол, так и упомянутые выше ГИМ, стимулировали репродукцию модельного вирусного вектора крВТМ:GFP. Также Поздышев Д.В. продемонстрировал, что предварительная инкубация растения в атмосфере с повышенным содержанием метанола ведет к созданию благоприятных условий для репродукции ВТМ. Автор делает заключение, что метанольный сигнал вызывает снижение устойчивости растения к вирусной инфекции, и объясняет это индукцией ГИМ, ответственных за регуляцию состояния плазмодесм (β -1,3-глюканаза, NCAPP и MIG-21), а также показанной в данной работе способностью NCAPP взаимодействовать с транспортным белком ВТМ.

Во второй главе раздела «Результаты и обсуждение» Поздышев Д.В. в рамках модели sink и source листьев рассматривает изменения концентраций метанола в нестрессовых условиях и выявляет ГИМ, связанные со снижением уровня метанола в процессе роста листа. Показано, что в соке sink зон листа концентрации метанола выше, чем в source. При проведении вычитающей подавляющей гибридизации для сравнения транскриптомов зрелых и растущих зон листа были идентифицированы гены, экспрессия которых повышена в условиях повышенного эндогенного уровня метанола. Один из таких генов (*SEOP*) оказался чувствителен и к экзогенному метанолу. Автор предполагает, что подобное свойство *SEOP* может говорить об участии этого гена в реакции растительной клетке на изменение уровня метанола в цитоплазме и апопласте. Также на основании полученных данных относительно реакции устьиц на повышенные концентрации метанола, Поздышев Д.В. предлагает модель перцепции растением газообразного метанольного сигнала через повышение уровня метанола в соке.

В третьей главе раздела предложена гипотеза о существовании механизма обратной связи в системе ПМЭ-метанол-ГИМ и приведены доказательства некоторых этапов предложенной схемы регуляции ГИМ. Автором были изолированы транскрипционные промоторы генов ПМЭ, а также одного из ГИМ, *NCAPP*. Были получены растения, несущие трансген *GUS* под контролем промотора *NCAPP*. На этих трансгенных линиях показано, что промотор *NCAPP* индуцируется метанолом. Для этих же растений показан низкий уровень накопления мРНК гена *NCAPP*, а также высокий уровень мРНК ПМЭ, что указывает на обратную корреляцию между экспрессией *NCAPP* и ПМЭ. Используя репортерные гены *GUS* и *GFP* под контролем промотора ПМЭ, Поздышев Д.В. показал, что при их ко-экспрессии с геном *NCAPP* происходит снижение уровня накопления соответствующих мРНК и белковых продуктов этих репортерных генов. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что *NCAPP* может являться фактором негативной регуляции, прямо влияющем на транскрипционную активность промотора ПМЭ.

В заключении автор обобщает полученные данные в рамках концепции «метанол как регулятор роста и иммунитета растений», рассуждает о возможных механизмах такой регуляции. Все данные из раздела «Результаты и обсуждение» получены впервые, научные положения, выносимые на защиту в представленной диссертационной работе, и выводы обоснованы. Список литературы включает в себя 173 ссылки, из них 169 – на статьи в международных журналах. В целом, представленная работа написана хорошим литературным языком, легко читается, хорошо иллюстрирована.

Вопросы и замечания

К представленному материалу имеются некоторые вопросы, замечания и пожелания:

(а) Несмотря на то, что обзор литературы дает достаточно полное представление о роли ПМЭ и метанола в жизни растения, нелишним было бы включить в него данные как по межклеточному транспорту и функционированию плазмодесм, поскольку в диссертации приводятся результаты по влиянию ГИМ на межклеточный транспорт, так и по особенностям межклеточного транспорта в *sink* и *source* листьях.

(б) В разделе II.2. приводится список генов с дифференциальной экспрессией в *sink* и *source* листьях по результатам вычитающей подавляющей гибридизации, указаны также гены, отобранные для дальнейшего анализа. Однако автор не останавливается подробно на функциях этих выбранных генов в растении, как это было сделано для первой группы ГИМ, и не обсуждает, какова возможная биологическая роль индуцируемости этих генов метанолом в связи с их основной функцией.

(в) Автор предполагает, что метанольный «сигнал передается именно через увеличение метанола в соке», однако, гены *1,3-β-глюканазы*, *MIG-21* и *ингибитора*

протеаз II не активируются в ответ на повышение уровня эндогенного метанола. Как же, по мнению автора, происходит перцепция метанольного сигнала от поврежденного растения в случае стрессового воздействия?

Однако приведенные вопросы и замечания не снижают научную значимость и высокую оценку работы.

По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из них 3 статьи в рецензируемых международных журналах и 6 тезисов международных конференций, достоверность результатов работы не вызывает сомнений.

Значимость полученных результатов для биологической науки


В теоретическом плане работа значительно расширяет представления о роли метанола в жизнедеятельности растения. Влияние метанола следует учитывать при изучении всех систем, связанных с механическим стрессом. Полученный список ГИМ может стать основой для дальнейшего исследования механизмов влияния метанола на растение. Практическая значимость работы обусловлена выявлением генов, способных к активации экзогенным метанолом. Для одного из таких генов *NCAPP* идентифицирован и изолирован транскрипционный промотор, также способный к индукции метанолом, что представляет особую ценность для биотехнологии.

Все выводы логично вытекают из представленных данных. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.


Заключение.

Диссертационная работа Поздышева Дениса Валерьевича «Участие генов, индуцируемых метанолом, в росте и устойчивости растений к стрессу», представляет собой самостоятельное целостное законченное исследование, оформленное в соответствии с требованиями «Положения ВАК РФ», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Работа рассмотрена и обсуждена на семинаре Лаборатории молекулярной диагностики ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН (протокол № 9 от 25 января 2016 г.)

Доктор биологических наук,
профессор, член-корреспондент РАН,
зав. Лабораторией молекулярной диагностики


Завриев С.К.

Подпись Завриева С.К. заверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН, д.ф.-м.н.


Олейников В.А.



СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук

Адрес: 117997, Российская Федерация, Москва ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

Веб-сайт: www.ibch.ru

E-mail: office@ibch.ru

Телефон: +7 (495) 335-01-00

Факс: +7 (495) 335-08-12

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ ЗА ПОСЛЕДНИЕ 5 ЛЕТ

1. Ryazantsev D.Y., Kvach M.V., Tsybulsky D.A., Prokhorenko I.A., Stepanova I.A., Martynenko Y.V., Gontarev S.V., Shmanai V.V., **Zavriev S.K.**, Korshun V.A. (2014). Design of molecular beacons: 3' couple quenchers improve fluorogenic properties of a probe in real-time PCR assay. *Analyst* **139** (11), 2867–72
2. Rogozhin E.A., Ryazantsev D.Y., Grishin E.V., Egorov T.A., **Zavriev S.K.** (2012). Defense peptides from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds. *Peptides* **38** (1), 33–40
3. Ryazantsev D.Y., Tsybulsky D.A., Prokhorenko I.A., Kvach M.V., Martynenko Y.V., Philipchenko P.M., Shmanai V.V., Korshun V.A., **Zavriev S.K.** (2012). Two-dye and one- or two-quencher DNA probes for real-time PCR assay: synthesis and comparison with a TaqMan™ probe. *Analytical and bioanalytical chemistry* **404** (1), 59–68
4. Ryazantsev D.Y.u., Petrova E., Kalinina N.A., Valyakina T.I., Grishin E.V., **Zavriev S.K.** (2012). Application of supramolecular DNA-streptavidin complexes for ultrasensitive detection of several toxins by immuno-PCR. *14. Global J. Anal. Chem.* **3** (17)
5. Стахеев А.А., Рязанцев Д.Ю., **Завриев С.К.** (2011). Выявление новых генетических маркеров для таксономической характеристики и идентификации грибов рода *Fusarium*. *Биорг. хим.* **37**, 662–671 ID:649
6. Stakheev A.A., Ryazantsev D.Y.u., Gagkaeva T.Y.u., **Zavriev S.K.** (2010). PCR detection of *Fusarium* fungi with similar profiles of the produced mycotoxins. *Food Control* **22** (3-4), 462–468
7. Stakheev A.A., Khairulina D.R., **Zavriev S.R.** (2016) Four-locus phylogeny of *Fusarium avenaceum* and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *Int J Food Microbiol.* V.**225**, p.27-37

Доктор биологических наук,
Проф., член-корр.РАН,
зав. Лаб. молекулярной диагностики

Завриев С.К.

Подпись Завриева С.К. заверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН, д.ф.м.н.

Олейников В.А.

