

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Авраменко Татьяны Викторовны на тему «Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

### Актуальность темы исследования

Понимание молекулярных механизмов взаимодействия растений с микроорганизмами является важной задачей, стоящей в настоящее время перед физиологией растений и биотехнологией. Одним из примеров такого взаимодействия является встраивание генов *Agrobacterium* в геном растений. Перенос генов *rol* *Agrobacterium rhizogenes* активирует биосинтез вторичных метаболитов и вызывает значительные изменения в защитном аппарате растений. С другой стороны, в ответ на биотическое или абиотическое воздействия в растительной клетке активируется экспрессия генов, кодирующих пероксидазы класса III, а также повышается их активность. Пероксидазы, как предполагают, играют важную роль в развитии защитной реакции на стрессовое воздействие. Более того, поскольку пероксидазы широко используются в биотехнологии, существует острая необходимость в получении эффективных продуцентов. Однако до настоящего времени не было известно, как трансформация генами *rol* влияет на экспрессию генов пероксидаз растений и изменение их активности. Поэтому диссертационная работа Авраменко Т.В., посвященная изучению активности и продукции пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rol*, является актуальным и оригинальным исследованием и представляет интерес, как для биотехнологии, так и для физиологии растений.

### Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

#### *Содержание диссертации*

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 290 публикаций. Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 9 таблиц и 14 рисунков.

Во введении автор описывает актуальность темы исследования, степень разработанности темы, после чего формулирует цель, задачи исследования и положения, выносимые на защиту.

В литературном обзоре Авраменко Т.В. приводит литературные данные о механизме трансформации клеток растений *Agrobacterium rhizogenes*, о влиянии на этот процесс агробактериальных генов *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*. Приводится характеристика указанных генов и анализируется эффект этих генов на вторичный метаболизм и продукцию активных форм кислорода (АФК) у растений. Отмечается, что трансформация индивидуальных генов *rolB* и *rolC* повышает устойчивость растений к действию абиотических факторов. Поскольку стрессовое воздействие, как правило, сопровождается повышением активности пероксидаз, автор далее рассматривает структуру и функции

растительных пероксидаз, а также их использование в биотехнологии. По мнению рецензента в обзоре не хватает информации о механизме активации экспрессии генов пероксидаз у растений. Только вскользь упоминается, что «генерация активных форм кислорода ....сопровождается активацией экспрессии защитных генов.....» (стр. 19 диссертации). Промоторы, транскрипционные факторы, вторичные мессенджеры, участвующие в активации экспрессии, остались за рамками обзора. В целом, следует сказать, что обзор написан хорошим языком. Приводится современная и актуальная научная литература по данной теме. Объем информации вполне достаточен, чтобы ввести читателя в проблему. К сожалению, отсутствуют выводы из обзора литературы. Присутствуют технические ошибки. После раздела 1.2 идет раздел 1.4, далее раздел 1.3 и снова раздел 1.4.

Раздел «Материалы и методы». В работе автор использовал современные методы молекулярной биологии, биохимии и физиологии растений, которые включали в себя использование клеточных культур растений, идентификацию генов пероксидаз, филогенетический анализ, определение экспрессии генов пероксидаз и активности изоферментов пероксидаз, а также определение уровня внутриклеточных АФК. Использованные методы адекватны для решения поставленных в исследовании задач. Раздел описан подробно, что позволяет повторить используемые в работе методы анализа другими исследователями.

Раздел «Результаты и обсуждение» начинается с идентификации и характеристики пероксидаз III класса марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.). Автор идентифицировал семь генов, кодирующих пероксидазы, а также проанализировал их нуклеотидную и аминокислотную последовательности. Обнаружена высокая степень гомологии аминокислотной последовательности между изоформами пероксидаз *R. cordifolia* и пероксидазами других растений. Проведен филогенетический анализ, что позволило автору разделить пероксидазы на два кластера в зависимости от аминокислотных замен в позициях 31 и 35, а также поместить пероксидазу *RcPtx07*, имеющую сайт связывания с кальмодулином, в отдельный подкластер. На основании этих данных автором сформулированы выводы 1 и 2, достоверность которых не вызывает сомнений.

На втором этапе автор изучал влияние генов *rol* на экспрессию генов пероксидаз, а также на активность и содержание изоферментов. Показано, что трансформация геном *rolB* вызывает активацию экспрессии генов пероксидаз и повышение активности фермента в культуре клеток *R. cordifolia*. Полученные результаты нашли отражение в выводе 3. Вывод вполне корректен и у рецензента нет возражений по существу. Однако, анализируя результаты, возникает вопрос, почему в качестве контроля использовали нетрансформированную культуру клеток, линию R? В подобных экспериментах, как правило, в качестве контроля используют линию, трансформированную вектором без целевого гена. Вероятность неспецифического эффекта значительно снижается, если принять во внимание, что трансформация геном *rolC* не приводит к активации, а также то, что активация пероксидаз в линиях с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* положительно коррелирует с уровнем экспрессии трансгена (вывод 4). Но и в этом случае нельзя полностью исключить, что повышение экспрессии трансгена достигается в результате множественных актов трансформации, соответственно,

активация экспрессии генов пероксидаз теоретически может объясняться неспецифическим эффектом.

Далее, в работе показано, что повышение экспрессии генов и активности ферментов пероксидазы не наблюдается при трансформации геном *rolC* или заражения растений диким штаммом A4 *A. rhizogenes*, который содержит гены *rolC* и *rolB* под своим собственным промотором (вывод 5). Автор строго не утверждает, что экспрессия гена *rolC* подавляет эффект экспрессии гена *rolB*, справедливо замечая, что при заражении диким штаммом уровень экспрессии *rolB* гораздо ниже, чем при трансформации плазмидой с целевым геном. Поэтому вывод 5 является совершенно корректным. Но возникает вопрос, почему автор не использовал растения, трансформированные плазмидой (или плазмидами), содержащими оба гена *rolB* и *rolC*? Другой вопрос, который возникает в ходе знакомства с работой, почему автор не изучал эффект трансформации на активность пероксидаз в целых растениях?

Поскольку было известно, что экспрессия гена *rolB* может модулировать уровень активных форм кислорода в клетках растений, то на следующем этапе автор поставил перед собой задачу «определить, является ли их активация (пероксидаз, прим. рецензента) *rolB*-специфичной функцией или неспецифичным компенсаторным механизмом на фоне изменения редокс-статуса в трансформированных клетках». Следует сразу отметить, что данной проблеме, сформулированной в диссертации и в автореферате, не соответствует ни одна из поставленных задач во введении, однако присутствует вывод 6. Чтобы решить данную проблему автор использовал клеточные культуры марены сердцелистной, трансформированные мутантными формами гена *AtCPK1* – кальций-зависимой протеинкиназы арабидопсиса. Оказалось, что трансформация постоянно активной формой *AtCPK1* вызывала значительное увеличение количества АФК в клетках, при этом наблюдалась только незначительная активация пероксидаз. На основании полученных результатов, автор сделал заключение, что «эффект активации является специфичной функцией гена *rolB*» (стр. 64) и сформулировал вывод 6, который звучит как: «Активация растительных пероксидаз III класса геном *rolB* является специфичным эффектом трансгена, и не обусловлена повышением уровня внутриклеточных активных форм кислорода на фоне трансформации». Не возражая по существу, необходимо отметить, что вместо того чтобы оценить роль АФК в активации пероксидаз в клеточной культуре, трансформированной геном *rolB*, автор измерял продукцию АФК в растениях, трансформированных геном *AtCPK1*. Эффект *rolB* на продукцию АФК уже ранее исследовался, и было показано, что экспрессия этого гена подавляет продукцию АФК (Bulgakov et al., 2012). Однако нельзя исключить, что экспрессия гена *rolB* приводит к временному повышению АФК (окислительному взрыву), что вызывает компенсаторную активацию генов пероксидаз, а также других антиоксидантных ферментов. Соответственно, на следующем этапе будет наблюдаться снижение АФК ниже контрольного уровня. Такая вероятность обсуждается в работе (Bulgakov et al., 2013), но не обсуждается в диссертации. Это предположение можно было бы легко проверить, выращивая трансформированные клетки в присутствии антиоксидантов. Если бы эффект антиоксидантов на активацию пероксидаз не наблюдался, то вывод 6 звучал бы более убедительно. В целом, при обсуждении результатов этого раздела не хватает «обсуждения. Для полноты картины диссертант мог бы привести данные о влиянии

трансформации на уровень АФК (Bulgakov et al., 2012), а также обсудить, если не АФК, то что (салicyловая кислота, этилен, жасмонат, абцизовая кислота) активирует экспрессию пероксидаз в случае трансформации геном *rolB*.

Далее автор изучил динамику экспрессии генов пероксидаз марены и их активность в зависимости от возраста культуры. Результаты подтвердили сделанный ранее вывод: в культуре клеток, трансформированной геном *rolB*, как уровень экспрессия генов пероксидаз, так и активность фермента были значительно выше, чем в контрольной культуре. В этом же эксперименте было показано, что трансформация геном *rolB* приводит к снижению количества биомассы (Таблица 8). Автор предполагает, что сверхпродукция пероксидаз представляет собой энергозатратный процесс, что очевидно и приводит к снижению биомассы. По мнению рецензента, данный результат, свидетельствующий, что экспрессия гена *rolB* имеет негативный эффект на рост и развитие, заслуживает отдельного вывода. Снижение биосинтетических процессов может объяснить, почему в *rolB* трансформированных клетках снижается продукция АФК и повышается устойчивость к стрессовому воздействию.

На следующем этапе автор провел сравнительный анализ эффекта трансформации гена *rolB* и ряда абиотических факторов на экспрессию и активность пероксидаз. Оказалось, что экспрессия генов пероксидаз и их активация при трансформации геном *rolB* значительно выше, чем при действии стрессовых воздействий. В завершении автор показал, что эффект гена *rolB* воспроизводится и на других клеточных культурах, таких как *Rhodiola roseus* и *Silene vulgaris*. Этим результатам посвящены выводы 7 и 8, которые сомнений не вызывают.

В целом рецензент отмечает, что полученные автором результаты являются совершенно новыми. На их основе сделаны корректные и достоверные выводы. Указанные замечания являются техническими или рекомендательными, их следует рассматривать как отдельные недочеты, присущие в любой оригинальной и интересной работе и которые желательно учесть в дальнейшем.

### **Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики**

Автором впервые идентифицированы семь генов пероксидаз III класса в растениях *R. cordifolia*. Изучен эффект трансформации генов *rolA*, *rhizogenes* на экспрессию генов пероксидаз и их активацию в клеточных культурах растений. Впервые показано, что трансформация геном *rolB* приводит к активации экспрессии и повышению активности пероксидаз. Такого эффекта не наблюдается при трансформации геном *rolC*. Полученные результаты могут быть использованы для биотехнологического получения эффективных продуцентов пероксидаз.

### **Опубликование результатов в научной печати**

Результаты и выводы диссертационной работы Авраменко Т.В. в полной мере представлены в печатных работах. Диссертант является автором 3 статей в рецензируемых международных журналах, которые входят в перечень ВАК РФ. Материалы диссертации

неоднократно представлялись Авраменко Т.В. на международных и отечественных конференциях.

### **Содержание автореферата**

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

### **Заключение**

Диссертационная работа Авраменко Т.В. «Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC*» имеет важное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов взаимодействия растений с микроорганизмами, а также для биотехнологии, отвечает всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Авраменко Татьяна Викторовна заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории физиологической генетики  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Сибирского института физиологии  
и биохимии растений Сибирского отделения  
Российской академии наук (СИФИБР СО РАН),  
доктор биологических наук

Адрес: 664033, Россия, Иркутск,  
ул. Лермонтова, д. 132, п.я. 314

e-mail: eugene@sifibr.irk.ru

рабочий телефон: +7(3952)510754

*E. Rikhvanov*

Рихванов Евгений Геннадьевич

Подпись Е.Г. Рихванова заверяю:  
Ученый секретарь СИФИБР СО РАН

кандидат биологических наук



*Т.В. Копытина*

Копытина Татьяна Васильевна

**Сведения об оппоненте**  
 по диссертационной работе **Авраменко Татьяны Викторовны**  
 на тему «**Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах**  
**растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC***»  
 представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
 специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Фамилия Имя Отчество	Рихванов Евгений Геннадьевич
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	03.01.05 – физиология и биохимия растений
Ученая степень и отрасль науки	Доктор биологических наук; биологические науки
Ученое звание	-
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук
Занимаемая должность	Ведущий научный сотрудник лаб. физиологии генетики
Почтовый индекс, адрес	664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317
Телефон	8 (3952) 426753
Адрес электронной почты	eugene@sifibr.irk.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Федяева А. В., Степанов А. В., Любушкина И. В., Побежимова Т. П., Рихванов Е. Г. Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 11. – С. 1476–1486.</li> <li>2. Рихванов Е. Г., Федосеева И. В., Варакина Н. Н., Русалева Т. М., Федяева А. В. Механизм гибели дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> при тепловом шоке. Эффект циклогексимида на этот процесс // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 1. – С. 22–32.</li> <li>3. Федосеева И. В., Рихванов Е. Г., Варакина Н. Н., Русалева Т. М., Пятрикас Д. В., Степанов А. В., Федяева А. В. Мутация <i>petite</i> подавляет индукцию синтеза Hsp104 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в стационарной фазе роста // Генетика. – 2014. – Т. 50, № 3. – С. 273–281.</li> <li>4. Рихванов Е. Г., Федосеева И. В., Пятрикас Д. В., Боровский Г. Б., Войников В. К. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, № 2. – С. 155–169.</li> <li>5. Пятрикас Д. В., Рихванов Е. Г., Федосеева И. В., Варакина Н. Н., Русалёва Т. М., Таусон Е. Л., Степанов А. В., Боровский Г. Б., Войников В. К. Митохондриальная ретроградная регуляция экспрессии <i>HSP101</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> при тепловом стрессе и</li> </ol>

- действии амиодарона // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 88-98.
6. Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Варакина Н.Н., Русалёва Т.М., Степанов А.В., Рихванов Е.Г., Боровский Г.Б., Войников В.К. Влияние амиодарона на термотолерантность и синтез Hsp104p у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. – 2012. - Т.77, №1. – С.99-109.
7. Федосеева И.В. Эффект ионов кальция на синтез Hsp104 и термотолерантность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / И.В. Федосеева, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева и др. // Микробиология. - 2010. - Т.79, № 2. - С.173–179.
8. Пуляевская М.А., Варакина Н.Н., Гамбург К.З., Русалёва Т.М., Степанов А.В., Войников В.К., Рихванов Е.Г. Фторид натрия подавляет синтез БТШ в культуре клеток *Arabidopsis thaliana*, подвергнутых воздействию теплового стресса // Физиология растений. 2011, Т. 58, С. 533–541.
9. Гамбург К.З., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Таусон Е.Л., Рихванов Е.Г., Боровский Г.Б., Войников В.К. Сравнение устойчивости к высокой температуре супензионных культур арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и теллунгиеллы (*Thellungiella salsuginea*). Докл. Акад. Наук, 2011, том 439, № 3, с. 421–424.
10. Перфильева А. И., Рымарева Е.В., Рихванов Е.Г. Влияние моноиодацетата натрия и тепловой обработки на продуктивность картофеля в вегетационных и полевых опытах // Агрохимия. 2013. № 6. С. 40-46.
11. Pyatrikas DV, Fedoseeva IV, Varakina NN, Rusaleva TM, Stepanov AV, Fedyaeva AV, Borovskii GB, Rikhvanov EG. Relation between cell death progression, reactive oxygen species production and mitochondrial membrane potential in fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions. FEMS Microbiol Lett. 2015 Jun;362(12).

Верно: Ученый отрасли курсов  
Сертификат со РАН

Должность и место работы лица,  
заверяющего сведения

Михонова И.Ф.

Фамилия И. О.

«14» декабря 2015 г.

