

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Тимербаева Вадима Рафаиловича, на тему: «Создание безмаркерных растений томата и яблони с геном суперсладкого белка», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология

Актуальность темы диссертационной работы

Технология создания трансгенных организмов основана на переносе генов из различных гетерологичных систем, поэтому трансгенные растения можно рассматривать как яркий пример преодоления физических, эволюционных и генетических барьеров. Наиболее часто исследователи используют метод агробактериальной трансформации, в результате которого в растительный геном интегрируется Т-ДНК, несущая последовательность селективного и целевого гена. Следует при этом отметить, что присутствие в генетически модифицированных растениях последовательностей вирусного и бактериального происхождения негативно принимаются обществом, а наиболее часто используемые в генной инженерии растений, конститутивные промоторы не всегда обеспечивают должную цель – тканеспецифичную экспрессию целевого гена. Создание трансгенных растений, которые не содержат генетического материала прокариотического происхождения, включая и гены селективных маркеров, делает такие растения более привлекательными для потребителя. Не менее важны исследования, связанные с поиском и характеристикой новых тканеспецифичных промоторов, под контролем которых экспрессия генов осуществляется непосредственно в конкретных тканях или на определенных стадиях развития растения. Несмотря на многочисленные исследования, выбор таких промоторов невелик. Диссертационная работа Тимербаева Вадима Рафаиловича посвящена получению безмаркерных растений томата и яблони, экспрессирующих ген суперсладкого белка тауматина II, при этом не содержащих функциональных последовательностей ДНК нерастительного происхождения. **Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность этой работы не вызывает сомнения.**

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ литературных источников, которые имеют непосредственное отношение к изучаемой проблеме. Обзор литературы охватывает широкий круг вопросов, а именно приводится: (1) краткое описание промоторов генов растений, в том числе и томатов; (2) современные данные об известных способах получения безмаркерных трансгенных растений; (3) дается характеристика суперсладкого белка тауматина и его использование в биоинженерии растений. В целом обзор литературы написан хорошим языком и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем изложены основные методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал классических и современных методов, применяемых в мировой практике культуральных, генетических и молекулярных исследований, анализа экспрессии генов, а также подходов к *in silico* анализу биологических текстов. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

Аналитическое рассмотрение Главы "Результаты и обсуждение" позволяет заключить следующее: соискателем была предпринята серия экспериментов, в целом, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи. Эта часть диссертационной работы включает три основных раздела, которые представлены подразделами.

Первая часть работы связана с клонированием и анализом промотора *ELIP* томата. Для этого соискатель первоначально проводит исследования, направленные на клонирование целевого промотора, с последующим анализом его последовательности. Результаты *in silico* анализа нуклеотидной последовательности позволили Вадиму Рафаиловичу сделать следующие обоснованное заключение: 5'-область гена *ELIP* томата содержит мотивы, отвечающие за регуляцию светом, реакции на фитогормоны (включая этилен), стрессовые реакции, циркадианный контроль, и высказать предположение, что этот промотор может регулируется сигналами, связанными с развитием растения и его активность, вероятно, повышается при созревании плодов. Поскольку диссертант выяснил, что промотор гена *ELIP* томата имеет функциональные элементы, это послужило отправной точкой для получения нескольких делеционных вариантов этого промотора и сравнительного анализа тканеспецифичного накопления белкового продукта репортерного гена. Полученные результаты показали, что промотор гена *ELIP* томата функционирует преимущественно в созревающих плодах растений томатов. Дополнительно, продемонстрировано, что наибольший уровень репортерного белка отмечен в плодах красной спелости в растениях с полноразмерным промотором (при использовании для трансформации растений вектора pBIE2165).

В связи с этим вполне логичными видятся дальнейшие исследований Вадима Рафаиловича по созданию безмаркерных растений томата, экспрессирующих целевой ген тауматина под контролем тканеспецифичных растительных промоторов томата: *ELIP* и известного *E8* промотора, которые представлены во второй части раздела.

Для получения безмаркерных трансгенных растений томата использовали вектор, несущий ген сайт-специфической рекомбиназы, слитый с лиганд-связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора, а также бифункциональный селективный ген *CodA-nptII*. Соискатель применил две стратегии отбора безмаркерных трансгенных растений томата: ранний отбор, когда отбор проводится на стадии образования каллуса т.е. без получения стабильных трансформантов растений, и отсроченную селекцию, которая предполагает получение стабильных трансформантов и последующие манипуляции с ними по удалению кассет с селективным геном и геном рекомбиназы.

Результаты проведенного сравнительного исследования позволили получить безмаркерные трансгенные растения томатов, и сделать определенные заключения в отношении использования двух протестированных подходов отбора: каждый подход имеет свои ограничения. А именно, стратегия раннего отбора характеризуется низкой эффективностью, а при использовании отсроченной селекции примерно у половины трансгенных растений томата отмечена неполная интеграция области Т-ДНК. Несмотря на эти проблемы в используемых подходах отбора трансгенных растениях, Вадиму Рафаиловичу удалось получить две потенциально безмаркерных линии растений томата, несущих целевой ген тауматина под контролем тканеспецифичных растительных промоторов томата: *ELIP* и *E8*. Дальнейший сравнительный анализ этих линий позволил получить доказательство экспрессии целевого гена тауматина как в листьях, так и плодах трансгенных растений на уровне транскрипции, а также подтвердить, что происходит образование белкового продукта целевого гена и оценить его уровень.

В третьей части диссертационной работы Вадима Рафаиловича представлены результаты исследований по созданию безмаркерных растений яблони, экспрессирующих целевой ген тауматина под контролем тканеспецифичного растительного промотора томата (использован *E8* промотор). В результате агробактериальной трансформации яблони получено три устойчивых к канамицину линии растений. Однако, молекулярный анализ полученных линий первичных трансформантов показал, что хотя интеграция целевого гена тауматина, а также других генов Т-ДНК области обнаружена во всех трех линиях, присутствие сайта рекомбинации, локализованного у левой границы Т-ДНК, выявлена только в одной линии, обозначенной соискателем как линия 6. На основании совокупности проведенных исследований Вадим Рафаилович делает заключение, что рекомбиназа R, трансляционно слитая с LBD, обладает постоянной минорной активностью даже без активации дексаметазоном, и это, вероятно, приводит к спонтанному вырезанию ДНК селективных генов, и снижает выход безмаркерных линий яблони. Тем не менее, дополнительный анализ показал, что в сублиниях растений, полученных из линии 6, после удаления нежелательной ДНК, происходит транскрипция гена тауматина II, и уровень транскрипции в некоторых сублиниях даже превосходит таковой для исходной линии 6.

Степень новизны результатов научных исследований.

Впервые клонирован и охарактеризован промотор гена *ELIP* томата. В его последовательности выявлены цис-регуляторные элементы. Функциональный анализ промотора *ELIP* выявил, что «полная» (условно названная так в данном исследовании) версия промотора способна обеспечивать высокий уровень экспрессии репортерного гена в спелых плодах томата. Впервые промотор *ELIP* использован для целевой наработки белка в плодах томата. Впервые показано, что классический промотор томата *E8* не обладает строгой плодовой специфичностью. Впервые получены безмаркерные растения томата и яблони, экспрессирующие ген суперсладкого белка тауматина под контролем преимущественно плодоспецифичных промоторов. Растения при этом не содержат генетических элементов нерастительного происхождения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа Тимурбаева Вадима Рафаиловича совмещает в себе и фундаментальность, и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о молекулярно-генетических механизмах, с помощью которых происходит интеграция и экспрессия гетерологичных генов в растениях. С практической точки данная работа интересна тем, что клонированный промотор *ELIP*, обеспечивающий высокий уровень экспрессии целевых генов в плодах томата, может быть применена для создания трансгенных растений других видов культур, в частности, для наработки в них различных белков, в том числе и медицинского назначения. Не менее важно и практической точки зрения апробированные в работе протоколы, которые позволяют получить безмаркерные растения томата и яблони, с использованием системы *rMF1*. Полученные при разработке протоколов результаты позволили выявить недостатки, тонкие методологические особенности системы отбора безмаркерных растений, что позволит в будущем планировать и проводить эксперименты с большей эффективностью.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований классических и современных биоинформатических, молекулярно-биологических и генетических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают

обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Вадима Рафаиловича, а также выносимых на защиту положений и выводов.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации Вадима Рафаиловича Тимербаева опубликованы в 4 статьях в зарубежных изданиях, рекомендованных ВАК. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возникло ряд вопросов:

1. Не ясно, что за линии растений томатов использованы дополнительно в эксперименте по иммуноферментному анализу растений томатов (рис. 13 и 9, в диссертации и автореферате, соответственно). В частности, линии eI-VIII-19, которая показала самый высокий уровень целевого белка.
2. Есть ли корреляция между уровнем транскрипционной активности перенесенного целевого гена и уровнем его белкового продукта в трансгенных растениях томатов?
3. На основании каких соображений или данных для получения трансгенных растений яблонь использован только промотор томатов *E8*, и не использован промотор гена *ELIP* томата?
4. Почему данные Саузерн-блоттинг родительских (Л1, Л2, Л6) и безмаркерных (6-3, 6-10) растений яблонь, а также результаты полуколичественного ОТ-ПЦР-и уровня экспрессии гена тауматина II, определенного методом ПЦР в реальном времени в безмаркерных сублиниях яблонь представлены только в автореферате (рис. 10, 11 и 12, соответственно), но не представлены в диссертационной работе?
5. Как рассчитан относительный уровень транскрипции целевого гена: — это значения ΔCt или $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (при использовании метода ПЦР в реальном времени)?

6. Есть ли данные (собственные или в публикациях других исследователей) об изменении уровня транскрипции в безмаркерных растениях по сравнению с исходными линиями, из которых они были получены? И с чем, по мнению соискателя, эти различия могут быть связаны?
7. Проводил ли соискатель статистический анализ всех количественных данных? С какой биологической и аналитической повторностью выполнены эксперименты?

По разделам диссертационной работе Вадима Рафаиловича Тимербаева имеется ряд замечаний и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя:

- работа только бы выиграла, если в конце раздела «Обзор литературы» Вадима Рафаиловича привел бы краткое заключение, в котором бы изложил какие вопросы остаются открытыми и какие эксперименты требуется провести.

- в тексте имеются некоторые стилистические погрешности неточности и неудачные выражения, и не профессиональное использование некоторых терминов и обозначений. Например, более профессионально было бы написать использовать обозначения: «Создание трансгенных растений, которые не содержат чужеродного генетического материала прокариотического происхождения» вместо «Создание трансгенных растений, которые не содержат чужеродного генетического материала, особенно бактериального и вирусного происхождения»; «после удаления нежелательной ДНК» вместо «после нежелательного удаления ДНК»; термин «тканеспецифичный» используется наряду с «тканеспецифический», следовало бы придерживаться единообразия, и т. д.

- Вестерн-блот – обозначение на рисунке образцов e1 и e8!!! (рис. 12 в диссертации и рис. 8 – в автореферате). e8-VI-22-6 и e1-XI-14 (на рисунке вместо e8-VI-22-6 и e1-VI-22-6 и вместо e8-VI-22 - e1-VI-22).

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и

методическом уровне, и оставляющей, в целом, хорошее впечатление. Следует еще раз отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокую квалификацию исполнения, что положительно характеризует самого исследователя.

Диссертационная работа на тему «Создание безмаркерных растений томата и яблони с геном суперсладкого белка» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор Тимербаев Вадим Рафаилович, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

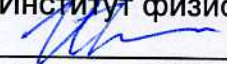
Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,

Руководитель группы функциональной геномики

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института физиологии растений им К.А. Тимирязева Российской академии наук,

 Голденкова-Павлова Ирина Васильевна

«20» мая 2020 года

Контактные данные: тел. +7 (499) 678-53-56; E-mail: irengold58@gmail.com;
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.01.07 – генетика. Адрес места работы: 127276 Российская Федерация, г. Москва, ул. Ботаническая, дом 35, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, группа функциональной геномики

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Ирины Васильевны Голденковой-Павловой удостоверяю:

Заместитель директора

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института физиологии растений им К.А. Тимирязева

Российской академии наук,


Марченко Нина Александровна

«20» мая 2020 года

