

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Ісаєнкова Станіслава Валентиновича «Молекулярно-генетична та функціональна характеристика мембранних транспортерів, залучених до регуляції соле- і посухостійкості у рослин та детоксифікації арсену», поданої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Рослини постійно зазнають дії стресових факторів навколишнього середовища. Абіотичні стреси зазвичай суттєво пригнічують ріст, розвиток та продуктивність рослин. Серед таких стресів одним з головних є посуха, також важливе значення має засолення, вплив важких металів та металоїдів. Транспортні протеїни, або транспортери, розташовані в мембранах клітинних структур, є одними з головних детермінантів водного та мінерального балансів рослин. Цей важливий тип білків відповідає не тільки за транспорт поживних речовин та посухостійкість рослин, а і бере участь у забезпеченні ширшого спектру фізіологічних функцій. Розуміння процесів поглинання, перерозподілу та накопичення у рослинному організмі головних моновалентних іонів та металоїдів, а саме Na^+ та K^+ , сполук арсену, є важливою складовою для з'ясування механізмів підтримання іонного гомеостазу, соле- та посухостійкості рослин, виведення токсичних сполук, мінімізації навантаження мінеральних добрив на ґрунти. Вивчення молекулярної природи цих процесів та функцій ключових мембранних транспортних протеїнів дає змогу суттєво розширити та доповнити існуючі уявлення про мінеральний транспорт, механізми регуляції сольового та осмотичного стресів, підтримки іонного гомеостазу та інших важливих метаболічних і фізіологічних процесів у рослинах та відкриває нові можливості для створення біотехнологічних рослин з підвищеною стійкістю до абіотичних стресів.

Таким чином, вважаю, що теоретичні й практичні проблеми, досліджені в дисертаційній роботі є актуальними.

Метою роботи було провести молекулярно-генетичний аналіз та здійснити функціональну характеристику мембранних транспортерів мінерального обміну та їхньої ролі у підтриманні осмотичного та іонного гомеостазу з метою підвищення посухо- та солестійкості рослин, а також у механізмах транспорту та детоксифікації сполук арсену

Основні положення дисертації відображені в 38 наукових праць (з яких 24 у фахових виданнях), та 14 тез у матеріалах всеукраїнських та міжнародних конференцій і з'їздів. Вони в повному обсязі висвітлюють зміст, результати та висновки дисертації.

Дисертація написана українською мовою. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження та їхнього обговорення, аналізу та узагальнення результатів, практичних рекомендацій, висновків та списку цитованої літератури, який складається з 456 найменувань. Робота викладена на 306 сторінках, містить 87 рисунків та 5 таблиць.

У вступі обґрунтовуються актуальність теми, мета та завдання роботи, наведені наукова новизна, практичне значення, особистий внесок дисертанта та інформація стосовно апробації роботи. В основу дисертаційної роботи покладені результати, отримані автором при виконанні наукових досліджень у відповідності до науково-тематичних планів Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» у відділах геноміки та молекулярної біотехнології та рослинних харчових продуктів та біофортificaції у рамках бюджетної теми «Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їхніх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (2012-16 р.р., номер держреєстрації 0112U001597), проекту «Вивчення молекулярно-клітинних основ транспорту мінеральних сполук

до різних типів клітинних вакуолей» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (2010-14 р.р., № 0110U004663) та проекту «Вивчення ролі та молекулярно-клітинної природи мембранних калієвих каналів з ячменю та рису в процесах підтримки мінерального гомеостазу, осмотичного шоку та водного стресу» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (2015-20 р.р., № 0115U005200).

Перший розділ являє собою аналітичний огляд літератури. В ньому викладено і проаналізовано основні результати експериментів, одержані іншими дослідниками з питань, що мають стосунок до задач, які вирішуються в дисертації.

В розділі "Матеріали та методи" наведено підходи та методи, які застосовувалися дисертантом для вирішення поставлених завдань. Вони включали молекулярно-генетичні (виділення та електрофоретичний аналіз ДНК та РНК, отримання кДНК, ПЛР, ПЛР у реальному часі, макроарей-аналіз, клонування фрагментів ДНК, сайт-направлений мутагенез, створення генів химерних білків, рестрикційний гідроліз ДНК, секвенування, трансформація бактерій плазмідами, рекомбіназне клонування на основі Gateway системи, біотехнологічні (культивування рослин *in vitro*, створення генетичних конструкцій, генетична трансформація рослин, рослинних клітин, дріжджів і мутантів бактерій), біохімічні (визначення вмісту іонів та As за допомогою фотометрії у полум'ї та HPLC-ICP-MS), мікроскопічні (електронна та конфокальна мікроскопія), фізіологічні (оцінка кондуктивності проростків, відносний приріст рослин, виділення ксилемного соку), біоінформатичні (робота з

базами даних, філогенетичний аналіз, комп'ютерний аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, робота з різноманітними веб-ресурсами) та методи статистичного аналізу.

Розділ 3 присвячений результатам досліджень. Автором встановлено, що високі концентрації Na^+ чи дефіцит K^+ у зовнішньому середовищі призводять до підвищення рівня транскрипції гена Na^+/K^+ -симпортера *HvNKT2;1*, що свідчить про участь цього транспортера у регуляції Na^+/K^+ балансу у рослин. Продемонстровано, що білок *HvNKT2;1* ячменю відіграє важливу роль у абсорбції чи реабсорбції K^+ у коренях при дуже низьких концентраціях цього елемента. Надекспресія гена *HvNKT2;1* у рослинах ячменю спричиняє транслокацію Na^+ із коренів у пагони та листя, підвищує загальний вміст цього елемента в тканинах рослин та посилює накопичувальний фенотип ячменю, що призводить до підвищення солестійкості цих рослин. У результаті кладистичного аналізу NHX-подібних послідовностей білків рослинного походження було продемонстровано існування чотирьох клад NHX-транспортерів. Виявлено нову кладу NHX-подібних послідовностей, до якої належить білок *AtNHX3* з *A. thaliana*. З'ясовано, що експресія гена протонно-натрієвого обмінника *HvNHX2* ячменю в клітинах тютюну покращує солестійкість цих рослин. Одночасно індукція експресії гена протонно-натрієвого обмінника *HvNHX4* ячменю відбувається за умови дії лише сольового, а не осмотичного стресу. Встановлено, що білок *AtTPK1* бере участь у вивільненні K^+ з вакуолі продихових клітин і, відповідно, впливає на процес закриття продихів, що свідчить про участь цього каналу у регуляції водного гомеостазу рослини. Рослини з надекспресією гена *AtTPK1* демонструють значно вищий рівень стійкості до дії осмотичного стресу, ніж рослини дикого типу та мутантних ліній, що вказує на участь даного каналу у регуляції осмотичного стресу. Виявлено, що функціонування двопорового каналу *AtTPK1* є відносно

незалежним від дії абсцизової кислоти. Робота цього білка є важливою у забезпеченні процесу проростання насіння і може компенсувати результати негативного впливу абсцизової кислоти на процес проростання. Підтверджено, що функціонування двопорового калієвого каналу *OsTPKb* є життєво важливим для росту та розвитку рослин. Виявлено, що цей двопоровий калієвий канал відіграє незамінну роль у процесах формування зернівок рису. Показано, що надекспресія гена калієвого каналу *OsTPKa* у рослин рису призводить до покращення показників посухостійкості та зменшення накопичення Na^+ у тканинах, проте посилення експресії *OsTPKb* покращує показники приросту рослин при дії сольового стресу сильніше, ніж при дії осмотичного стресу. Встановлено різну вакуолярну локалізацію двопорових калієвих каналів рису, а саме *OsTPKa* та *OsTPKb*. Виявлено, що калієвий канал *OsTPKb* локалізується у тонопласті протеїнових вакуоль, у той же час локалізація білка *OsTPKa* є характерною для мембран центральних літичних вакуоль. Продемонстровано, що транспорт білка *OsTPKb* до протеїнових вакуоль може відбуватись безпосередньо з ендоплазматичного ретикулуму до органели призначення без залучення апарату Гольджі. Доведено, що ділянка С-кінця між двома коровими EF-мотивами калієвих каналів *OsTPKa* та *OsTPKb* є надзвичайно важливою для подальшого вакуолярного розпізнавання цих двох білків. Заміни у амінокислотній послідовності цієї ділянки залишку валіну у положенні 303 на залишок лейцину, залишку аспарагіну у положенні 313 на залишок серину та залишку лізину у положенні 326 на залишок аспарагіну призводять до зміни вакуолярної локалізації білка *OsTPKa*. Можна припустити, що фосфорилування залишку серину у положенні 313 відіграє суттєву роль у його адресній доставці у протеїнові вакуолі. Незважаючи на велику спорідненість двопорових калієвих каналів із тютюну, а саме *NtTPK1a* та *NtTPK1b*, до білка *AtTPK1* для них характерна різна

субклітинна локалізація. Білок NtTPK1b накопичується у везикулярних структурах, відмінних від «класичних» літичних вакуоль. Продемонстровано, що більшість каналів родини ТРК із *A. thaliana* (білки AtTPK1, 2, 5) та два білки двопорових каналів із рису, зокрема OsTPKa та OsTPKb, можуть формувати функціональну та потужну систему транспорту калію у клітинах *E. coli*. Виявлено, що акваліцеропорин AtNIP7;1 із *A. thaliana* забезпечує транспорт тривалентної форми арсену (As^{III}) через плазматичну мембрану та відіграє важливу роль у процесах поглинання цієї форми As у рослин. Встановлено, що експресія гена, який кодує активну систему видалення As^{III} із дріжджів - ScACR3, в *A. thaliana* підвищує стійкість рослин до впливу арсену і на клітинному рівні, і на рівні організму в цілому. ScACR3 підсилює здатність рослин видаляти As з тканин та сприяє його перерозподілу з коренів до пагонів.

В розділі 4 проведено аналіз та узагальнення результатів.

Автором пропонується ціла низка практичних рекомендацій, які цілком пов'язані з темою дисертації.

Висновки роботи витікають із експериментальних даних, одержаних автором.

Не дивлячись на загалом позитивне враження, щодо наукових надбань, форми їх осмислення та викладення, в дисертаційній роботі є деякі недоречності і недоліки.

1. На мою думку було б правильніше вказати і закордонні наукові центри в яких автор дисертації виконував свою роботу.

2. Рисунок 3.7 невдало ілюструє отримані автором результати. Контрольні рослини виглядають досить погано навіть при звичайних умовах.

3. На мій погляд при вивченні стійкості отриманих трансгенних рослин тютюну з геном протонно-натрієвого обмінника ячменю HvNHX2 до

сольового стресу краще було б рослини вирощувати при різних концентраціях NaCl для уточнення рівня концентрації при якому зберігається продуктивність отриманих рослин на рівні контролю

4. На мою думку вираз «ген каналу» виглядає досить кострубато, краще буде «ген, що кодує канал формуючий білок (транспортер)»

5. Висновок 15 дуже загальних і може бути просто вилучений.

Вказані недоліки не знижують загальний рівень поданої дисертаційної роботи.

Висновок

Дисертаційна робота Ісаєнкова Станіслава Валентиновича є закінченим науковим дослідженням, в якому проведено комплексне дослідження та функціональна характеристика мембранних транспортних протеїнів рослин, які беруть участь у транспорті моновалентних іонів та металоїдів (As). Ім. було продемонстровано участь цих мембранних транспортних білків у механізмах соле- та посухостійкості, іонного гомеостазу та детоксифікації. Розроблено ефективні підходи для біотехнологічного та молекулярно-генетичного покращення важливих агрономічних та технологічних характеристик рослин, зокрема посухо- та солестійкості, збагачення на калій, зменшення або збільшення вмісту арсену. Дисертантом отримано значні за науковою цінністю результати, що мають важливе теоретичне та практичне значення. Достовірність одержаних результатів та висновків, що ґрунтуються на їх аналізі, забезпечується великим обсягом зібраного дисертантом матеріалу, його адекватним опрацюванням і застосуванням новітніх методів досліджень. Вважаю, що робота цілком відповідає спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика

Основні матеріали роботи опубліковані у фахових виданнях. Автореферат достатньо повно висвітлює основний зміст дисертації та основні одержані експериментальні дані.

Все вище наведене цілком переконливо доводить, що дисертаційна робота Ісаєнкова Станіслава Валентиновича «Молекулярно-генетична та функціональна характеристика мембранних транспортерів, залучених до регуляції соле- і посухостійкості у рослин та детоксифікації арсену» за актуальністю висвітлених питань, їх теоретичним та практичним обґрунтуванням, обсягом проведених досліджень цілком відповідає чинним вимогам щодо докторських дисертацій, а її автор заслуговує присвоєння наукового ступеня доктора біологічних наук.

Офіційний опонент

Директор

Інституту клітинної біології та
генетичної інженерії НАН України,

доктор біологічних наук

професор, член-кор. НАН України



М.В. Кучук