



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Коми научный центр Уральского отделения
Российской академии наук»
(ФИЦ Коми НЦ УрО РАН)

РОССИЯСА НАУКА ДА ВЫЛЫС ВЕЛӚДЧАН
МИНИСТЕРСТВО

«Россияса наукаяс академиялӧн
Урал юкӧнса Коми наука шӧрин»
туялан удж нуӧдысь федеральной шӧрин
Федеральной канму
сьӧмкуд наука учреждение
(ТФШ РНА УрЮ Коми НЦ)



УТВЕРЖДАЮ
Исполняющий обязанности директора
ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, д.э.н.
А. Г. Шеломенцев
« 14 » марта 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения
Российской академии наук»
на диссертационную работу Онеле Алфреда Обинна «Биохимические и молекулярные
особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Онеле Алфреда Обинна посвящена изучению молекулярных и биохимических характеристик важных антиоксидантных ферментов – пероксидаз эволюционно-древнего мха *Dicranum scoparium*, представителя наиболее широко распространенного отдела Настоящие мхи (Bryophyta). Бриофиты были первыми зелеными растениями, которые колонизировали сушу и выработали механизмы адаптации к жизни на ней. Как и многие другие виды несосудистых высших растений, *D. scoparium* способен выживать при длительном обезвоживании благодаря наличию конститутивных и индуцируемых механизмов устойчивости. Обезвоживание сопровождается усиленной генерацией активных форм кислорода (АФК), в снижении уровня которых важную роль играют пероксидазы. Однако совершенно неизвестны функциональные характеристики пероксидаз, их локализация и значение в организме *D. scoparium* при обезвоживании, регидратации и действии других стресс-факторов. Исследования пероксидаз дикранума являются важным звеном расшифровки функций этих ферментов и, в целом, могут способствовать более полному пониманию развития генетических механизмов стресс-

устойчивости растений в процессе эволюции. Геном *D. scoparium* не секвенирован, поэтому перед диссертантом стояла непростая задача идентификации генов, характеристики белков и функциональной локализации пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы, активно участвующих в защите от окислительного стресса при действии абиотических стресс-факторов. Таким образом, рассматриваемая диссертационная работа А. Онеле представляется актуальной для фундаментальной и прикладной науки.

Структура и содержание диссертационной работы, достоверность, новизна и научная значимость полученных результатов

Композиционно диссертационная работа А. Онеле включает 5 основных разделов: введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение. Логично завершают диссертацию заключение и выводы. Библиографический список включает 417 наименований, из них подавляющая часть на иностранном языке. Работа иллюстрирована качественными документальными фотографиями, рисунками и таблицами. Текст изложен хорошим научным языком, но в отдельных случаях нет расшифровки аббревиатуры соединений (белков) на английском языке (с. 21, 22 и т.д.). То же самое касается использованных сокращений (с. 5), где английские аббревиатуры даны только в русском варианте (для ясности желательно было бы привести английский вариант).

Из обзора видно, что А. Онеле хорошо знает работы отечественных и зарубежных авторов по рассматриваемой проблеме. Даны ботаническое описание и особенности жизненного цикла *D. scoparium*, определяющих его физиологию. Изложены представления о стрессовой устойчивости бриофитов. Особое внимание уделено механизмам обезвоживания как специализированной сети мультигенных и многофакторных процессов. Объяснены понятия конститутивной и индуцибельной устойчивости. Описаны стратегии ответных реакций бриофитов на действие неблагоприятных факторов. Рассмотрены механизмы образования АФК при абиотическом стрессе. Даны представления о системе антиоксидантной защиты растений. Большая часть информации посвящена семейству пероксидаз, их биохимической характеристике, структуре белка, кодирующим пероксидазы генам, механизмам работы и регуляции активности ферментов в растительной клетке. Внимание акцентировано не только на анти-, но и прооксидантной функции пероксидаз, что в дальнейшем обсуждается в диссертации. Отдельной главой рассмотрена аскорбатпероксидаза, относящаяся к пероксидазам I класса и имеющая важную функциональную приуроченность в клетке, связанную с состоянием пула мощного антиоксиданта – аскорбата. Обзор литературы составлен на основе современных источников

и имеет аналитический характер, что выражается в сделанном А. Онеле заключении и обосновании цели собственного исследования.

Сведения, приведенные в главе 2 диссертации, дают представление об основном объекте и других видах мхов, использованных в исследованиях, районе отбора проб, условиях стрессовых воздействий, проведенных в лабораторных условиях, получению ферментативной вытяжки и белковой фракции клеточной стенки, определению активности ферментов в тканях, содержанию АФК. Целый блок главы 2 посвящен молекулярно-генетическим методам и биоинформатическому анализу идентификации генов и структуры белка пероксидаз. Особо отметим, что А. Онеле успешно проведена огромная методическая работа, включающая очистку белков методом ионнообменной хроматографии, выделение РНК и синтез кДНК, электрофорез нуклеиновых кислот, молекулярное клонирование и определение нуклеотидной последовательности ДНК, идентификацию и анализ субклеточной локализации пероксидаз на основе метатранскриптомных данных и различных биоинформатических программ, а также первичной, вторичной и третичной структуры белка. Сделан филогенетический и сравнительный анализ последовательности пероксидаз. Проведено определение экспрессии генов с использованием разработанных ген-специфических праймеров. В сумме применено более 20 методик. Результаты исследований обработаны статистически, что важно для подтверждения их достоверности.

Около половины объема диссертации составляет изложение и обсуждение полученных автором данных. Отметим обладающие новизной и наиболее значимые в научном и теоретическом отношении результаты.

В диссертационной работе А. Онеле показана способность *D. scoparium* к быстрой генерации АФК (гидроксильного и супероксид-радикала, перекиси водорода) при гидратации сухого мха и обезвоживании. Данные указывают на то, что при засухе освобождаемая во время регидратации H_2O_2 накапливается в апопласте и индуцирует запуск программ засухоустойчивости.

В цикле обезвоживание/регидратация диссертантом выявлена высокая конститутивная активность пероксидаз класса III *D. scoparium* с различными изоформами и одновременно их способность к относительно быстрому изменению своей активности. Впервые выявлено, что пероксидазы класса III изучаемого вида характеризуются не только антиоксидантными свойствами, но и могут проявлять прооксидантную функцию, деградируя перекись в супероксид, что является характеристикой высокой адаптационной способности для успешной колонизации различных экологических ниш.

Вызывают большой интерес и обладают новизной данные об идентификации 22 генов пероксидаз класса III дикранума (*DsPOD*) из архива чтений последовательностей и последующей верификацией полученных *in silico* транскриптов путем клонирования и

секвенирования двух *DsPOD*, имеющих высокую гомологию с генами пероксидаз других видов мхов (в том числе *Physcomitrella patens* с полностью секвенированным геномом). С помощью изоэлектрического фокусирования белков и детального биоинформатического анализа А. Онеле выявлено 13 изоформ пероксидаз с достаточно стабильной структурой, десятью консервативными мотивами, сайтами фосфорилирования и N-гликолизирования (соответствующих аминокислот). Проведен компьютерный анализ вторичной и третичной структуры *DsPOD* и построены модели третичной структуры. Выявлены белки с высокоомологичной структурой, несущие, скорее всего, одинаковые функции.

На основе построенного филогенетического древа диссертантом исследованы эволюционные связи между пероксидазами III класса дикранума и других видов растений. Сделано заключение, что разнообразие изоформ пероксидаз может быть результатом дубликаций в геноме предков, а дивергентность изопероксидаз возникла до разделения на сосудистые и несосудистые высшие растения.

Диссертантом также впервые выполнен полный анализ идентификации гена, последовательности и структуры белка аскорбатпероксидазы (APX) дикранума. Показана высокая гомология *DsAPX* с APX *P. patens* и *G. pilifera* и цитозольная локализация фермента. Автором обнаружена высокая консервативность третичной структуры *DsAPX* и принадлежность *DsAPX* и APX других мхов одной кладе (в отличие от *DsPOD*), что указывает на общего предка APX бриофитов.

А. Онеле впервые изучил экспрессию идентифицированных генов *DsPOD* и *DsAPX* при действии абиотических стрессоров (ионов кадмия, параквата, неблагоприятных температур, обезвоживании/регидратации) и выявил различную вовлеченность генов в ответную реакцию.

Завершают работу выводы, которые соответствуют поставленной цели и задачам исследования, сформулированы четко и адекватны полученным результатам.

Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы, в нем показан личный вклад автора в проведенное исследование, степень научной новизны и практическая значимость результатов исследований, отражены выносимые на защиту положения диссертационной работы, а также указаны определенные практические рекомендации по использованию данных диссертационной работы. Содержание автореферата соответствует тексту диссертации и указанным публикациям. Единственное замечание по оформлению автореферата – слишком мелкий шрифт текста, затрудняющий прочтение и усвоение материала.

А. Онеле проводил исследования в соответствии с планом научных исследований КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (№ АААА-А18-118022790082-2). Исследования по теме

диссертации были поддержаны грантами РФФИ (№ 17-44-160142) и Правительства Республики Татарстан (№ 18-44-160031).

По результатам диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследований прошли апробацию на всероссийских и международных конференциях, а также итоговых конференциях КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Замечания и вопросы по диссертации

1. В диссертации приводится общая информация по биологии мхов и их реакция на потерю влаги. Однако недостаточно полно обоснован выбор *Dicranum scoparium* в качестве объекта исследований. Отсутствует информация об условиях обитания, состоянии растений при отборе образцов.

2. Хотелось бы получить более детальное описание определения гидроксильного радикала в тканях. В диссертации приводится ссылка Gómez-Toribio et al. (2009). Согласно описанию, концентрацию $\cdot\text{OH}$ определяли по содержанию продукта окисления дезоксирибозы, реагирующего с тиобарбитуровой кислотой. При этом образование $\cdot\text{OH}$ происходит в реакции Фентона при взаимодействии пероксида водорода из экстрактов побегов мха с солями железа. Вероятно, данный метод больше подходит для определения содержания пероксида водорода, нежели гидроксильного радикала.

3. Эксперименты для выявления образования АФК проведены, на наш взгляд, не вполне логично и последовательно, что затрудняет сопоставление полученных результатов. Так, например, данные по содержанию $\cdot\text{OH}$ приводятся при гидратации сухого мха, а данные по содержанию H_2O_2 и супероксид-радикала получены в опытах по обезвоживанию/регидратации.

4. Следовало бы обосновать выбор концентраций CdCl_2 и параквата (100 мкМ), использованных для индукции окислительного стресса. Мхи, как известно, являются аккумуляторами и биоиндикаторами загрязнений среды. Способны накапливать тяжелые металлы в больших концентрациях, токсичных для других растений (Lepp N.V. 6. Bryophytes and Pteridophytes // *Metals in the environment; analysis by biodiversity*. 2001. Ed. M.N.V. Prasad. P. 159-170).

5. Диссертант высказывает интересную идею о способности пероксидаз проявлять прооксидантную активность. Каков механизм переключения антиоксидантной функции пероксидаз на прооксидантную? Что известно о данном сигналинге?

6. В тексте диссертации имеются, по-видимому, опечатки. В частности, в разделе 3.2.1. есть повтор описания результатов (с. 54, 55 «Обнаружено, что...»), в разделе 2.5. – недочеты при написании размерности коэффициентов молярной экстинкции веществ, используемых

для измерения активности пероксидаз (с. 40), а в таблицах и на рисунках нет единого обозначения размерности активности пероксидазы (с. 52; 53; 55 и т. д.).

В целом, высказанные замечания не влияют на научную значимость диссертационной работы.

Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о порядке присуждения ученой степени кандидата биологических наук

На основании выполненных исследований Онеле Алфред Обинна получил новые данные о последовательности генов, структуре белков и активности пероксидаз класса III и аскорбатпероксидазе мха *Dicranum scoparium*. Выявлены консервативные сайты в белках пероксидаз, необходимых для проявления каталитической активности. На основе построенных филогенетических древ исследована молекулярная эволюция и происхождение пероксидаз дикранума. Показано, что пероксидазы дикранума могут проявлять как антиоксидантную функцию, так и участвовать в образовании супероксидного радикала, что в целом важно для понимания изменений баланса про-/антиоксидантных реакций в растительной клетке.

Полученные в работе результаты обладают новизной, имеют теоретическое значение для развития представлений о функционировании пероксидаз как важных антиоксидантных ферментов, способных проявлять прооксидантную функцию. В работе применены высокие технологии молекулярно-генетического и биоинформатического анализа, позволившие провести полную идентификацию 22 генов *DsPOD* и гена *DsAPX* и структуре кодируемых ими изоферментов. Данная диссертация может быть основой методических рекомендаций при расшифровке генов и белков в растениях.

Практическая значимость результатов проведенного исследования состоит в обосновании использования *D. scoparium* в качестве удобной модели для изучения роли пероксидаз в стресс-реакции растений. Примененный широкий арсенал физиологических, биохимических, молекулярно-генетических методов и биоинформатического анализа в совокупности с полученными результатами может быть использован в исследованиях механизмов стресс-толерантности несосудистых растений, проведения экологического мониторинга и мер по повышению устойчивости сельскохозяйственных культур. Материалы диссертации могут быть рекомендованы для использования в качестве дополнений в общем курсе лекций по физиологии растений, стрессологии, биохимии и молекулярной биологии в ВУЗах.

Данные, представленные в диссертации, воспроизводимы и обработаны статистически. Выводы логически вытекают из результатов, не противоречат основным биологическим постулатам и находят подтверждение в работах других авторов. Материалы диссертации

представлены в публикациях, обсуждены на международных и всероссийских научных конференциях.

Диссертационная работа «Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденному Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции от 11 октября 2021 г.), предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Онеле Алфред Обинна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Диссертация и отзыв обсуждены на заседании лаборатории экологической физиологии растений Института биологии – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» (ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН). Итоги голосования – «за» единогласно (протокол № 1 от 11 марта 2022 года).

Отзыв подготовлен:

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории экологической физиологии растений
ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН

Гармаш Е.В.

Организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения
Российской академии наук» (ФИЦ Коми НЦ УрО РАН)

Сайт: <http://www.komisc.ru>

E-mail: info@frc.komisc.ru

Тел.: (8212) 24-10-26, факс: (8212) 24-22-64

Почтовый адрес: Коммунистическая ул., д. 24, Сыктывкар, ГСП-2, Республика Коми,
167982

Подпись (и)	
заведующий	
Ведущий документовед Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»	
	О.Л. Заболоцкая
	«11 марта» 2022 г.