

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.225.02,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 30.03.2022 № 12

О присуждении **Онеле Алфреду Обинна**, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация **«Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.»** по специальностям 1.5.21 – физиология и биохимия растений принята к защите 27.01.2022 г. (протокол № 8) диссертационным советом 24.1.225.02, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский Научный Центр Российской академии наук» (ФИЦ КазНЦ РАН) Министерства образования и науки Российской Федерации 420111, г. Казань, ул. Лобачевского д. 2/31 (приказ Минобрнауки РФ №788/нк от 09.12.2020 г.).

Соискатель, **Онеле Алфред Обинна**, 27.10.1988 года рождения, в 2015 году окончил ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет по специальности «Биохимия». В 2019 г. окончил очную аспирантуру при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по направлению 06.06.01 Биологические науки. С 2019 г. по настоящее время **Онеле А.О.** работает в лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма Казанского института биохимии и

биофизики - обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН) Министерства науки и высшего образования РФ в должности младшего научного сотрудника. Диссертация Онеле А.О. выполнена в лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, Часов Андрей Васильевич, старший научный сотрудник лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Официальные оппоненты:

1. **Максимов Игорь Владимирович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии иммунитета растений, Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа.

2. **Емельянов Владислав Владимирович** – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики и биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург.

Оба оппонента дали положительные отзывы на диссертационную работу Онеле А.О.

Ведущая организация – Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Сыктывкар – в своем положительном заключении, подписанном исполняющим обязанности директора, доктором экономических наук Шеломенцевым А.Г. указано, что диссертация Онеле А.О. посвящена изучению молекулярных и биохимических характеристик важных антиоксидантных ферментов и

является актуальной для фундаментальной и прикладной науки. Указанные в отзыве вопросы и замечания не снижают научную значимость диссертационной работы. Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Онеле Алфред Обинна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Соискатель имеет 17 опубликованных работ по теме диссертации, из них 3 опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных информационно-аналитических системах научного цитирования, входящих в перечень журналов, рекомендованных ВАК. Во всех 3 рецензируемых работах Онеле А.О. является первым автором. Общий объем опубликованных по теме диссертации работ составляет 32 страницы. Работы написаны соискателем в соавторстве с другими исследователями, личный вклад диссертанта заключается в выполнении основной части экспериментов, в анализе данных литературы и обобщении полученных результатов. Диссертационная работа содержит достоверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Onele, A.O. Biochemical characterization of peroxidases from the moss *Dicranum scoparium* [Text] / A.O. Onele, A. Chasov, L. Viktorova, R.P. Beckett, T. Trifonova, F. Minibayeva // South African Journal of Botany. – 2018. – V. 119. – P. 132–141. DOI:10.1016/j.sajb.2018.08.014 (Scopus, Web of Science).
2. Онеле, А.О. Аскорбатпероксидаза мха *Dicranum scoparium*: идентификация гена, активность фермента [Текст] / А.О. Онеле, А.В. Часов, Т.В. Трифонова, Ф.В. Минибаева // Доклады академии наук. Биохимия, биофизика, молекулярная биология. – 2019. – Т. 489. – С. 92–96. DOI: 10.31857/S0869-56524894424-428 (Scopus, Web of Science).

3. Onele, A.O. Characterization and expression analysis of ascorbate peroxidase from the moss *Dicranum scoparium* during abiotic stresses [Text] / A.O. Onele, A.V. Chasov, L.V. Viktorova, F.V. Minibayeva, R.P. Beckett // Bryologist. – 2021. – V. 124. – P. 68–84. DOI:10.1639/0007-2745-124.1.068 (Scopus, Web of Science).

На диссертацию и автореферат поступило 10 отзывов: от д.б.н., в.н.с. лаборатории зимостойкости, руководителя отдела физико-химических методов исследования ФГБУН Институт физиологии растений РАН Мошкова Игоря Евгеньевича; от к.б.н., доцента Института живых систем ФАГАО ВО «БФУ им. Канта» Федурева Павла Владимировича; от к.б.н., н.с. лаборатории экологической физиологии растений ФГБУН Института биологии ФИЦ «Карельский научный центр РАН» Игнатенко Анны Анатольевны; от д.б.н., профессора кафедры биологии растений и животных ФГБОУ ВО «Воронежского Государственного Педагогического Университета» Ершовой Антонины Николаевны; от к.б.н., доцента кафедры физиологии и биохимии растений, заведующей кафедрой экспериментальной биологии и биотехнологии Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина» Киселевой Ирины Сергеевны; от к.б.н., н.с. лаборатории экологической физиологии растений Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН Шелякина Михаила Анатольевича; от к.б.н., зав. лаборатории молекулярной и экологической физиологии ФГБУН «Ботанический институт им. В.Л. Комарова» РАН Войцеховской Ольги Владимировны; от д.б.н., г.н.с. Института фундаментальных проблем биологии «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» Иванова Бориса Николаевича; от д.б.н., с.н.с., руководителя группы экологии и физиологии фототрофных организмов Института фундаментальных проблем биологии ФИЦ НЦБИ РАН Кособрюхова Анатолия Александровича; от д.б.н., профессора кафедры

агрономии, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО Омский ГАУ, профессора Плотниковой Людмилы Валерьевны.

Все отзывы положительные. Онеле А.О. ответил на вопросы, заданные в отзывах. В отзывах Федураева П.В., Ершовой А.Н. и Шелякина М.А. высказаны вопросы, касающиеся концентрации эффекторов и методик, использованных в работе. Автор диссертации пояснил, что концентрации эффекторов подбирались, исходя из ранее проведенных в лаборатории исследований, литературных данных и подробно разъяснил методику проведения экспериментов по обезвоживанию/регидратации и температурным воздействиям. Подтвердил, что скорость обезвоживания по-разному влияет на активность пероксидазы, и что при температурном воздействии может происходить обезвоживание образцов. Онеле А.О. подтвердил, что экспрессия проводилась за счет увеличения содержания соответствующих м-РНК, и что отсутствие активности некоторых экстраклеточных пероксидаз, предсказанных биоинформатически, может быть обусловлено тем, что гены этих изоформ, вероятно, экспрессируются при индукции стрессорами, отличными от тех, которые использовались в этом исследовании или на определенных стадиях развития мха.

На вопрос Киселевой И.С. о вовлечении процессов дыхания и фотосинтеза в образование АФК при гидратации сухого мха и доказательства участия пероксидазы III класса в образовании АФК Алфред Онеле пояснил, что при гидратации сухого побега активируются процессы фотосинтеза и дыхания, которые могут также являться источниками АФК. Согласно литературным данным, основными источниками АФК, образующихся во время окислительного взрыва в растительных клетках, вероятно, являются ферменты, локализованные на внешней поверхности растительных клеток, в частности NAD(P)H-оксидазы или другие оксидазы и/или пероксидазы клеточной стенки. Данный вопрос был подробно освещен в диссертации.

На вопрос Игнатенко А.А. о вероятности восстановления пероксидазной активности после стрессового воздействия Онеле А.О.

пояснил, что поддержание высокого уровня или увеличение активности пероксидазы при водном или температурном стрессе важно для предотвращения накопления АФК и окислительного повреждения. Восстановление активности пероксидазы при регидратации или активирование пероксидазы при воздействии температур может быть следствием ряда причин: высокой устойчивости самого фермента, широкой субстратной специфичности и наличия множества изоферментов.

Рядом авторов отзывов также были высказаны замечания по точности формулировок и интерпретации данных, с которыми автор диссертации согласился.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области стрессологии, биохимии и физиологии растений и имеют научные работы, опубликованные в центральных российских и зарубежных изданиях, относящихся к тематике защищаемой диссертации. Ведущая организация является признанным научным центром РФ, занимающимся фундаментальными проблемами биологии, в том числе в областях физиологии и биохимии растений.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

доказана гипотеза, согласно которой пероксидазы мхов, как и пероксидазы сосудистых растений, являются одними из ключевых ферментов, участвующих в стрессовых реакциях. Стресс-индуцируемая активность и наличие консервативных элементов в структуре генов и белков пероксидаз *D. scoparium* свидетельствуют о сохранении этих последовательностей в геноме растений в ходе эволюции ввиду важности пероксидаз III класса и аскорбатпероксидаз в поддержании окислительно-восстановительного статуса растений.

Разработана методика применения 2D электрофореза после изофокусирования белков, позволяющая выявлять про- и антиоксидантную

активность пероксидаз III класса мхов посредством соответствующих визуализирующих окрашиваний.

Предложены референсные гены, позволяющие исследовать экспрессию пероксидаз мха *D. scoparium* в стрессовых условиях.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

применительно к проблематике диссертации эффективно использован комплекс классических и современных биохимических и молекулярно-биологических методов исследования;

изучены характеристики пероксидаз мха дикранума метловидного и установлено, что все изоферменты пероксидазы класса III мха обладают как про-, так и антиоксидантной активностью. Впервые показано, что во мхе *D. scoparium* изоферменты пероксидаз принимают участие в образовании супероксидного анион-радикала;

изучены с помощью *in silico* анализа и впервые идентифицированы в данном мхе 22 гена пероксидаз класса III и ген аскорбатпероксидазы, а также белки, кодируемые данными генами. На основании филогенетического анализа аминокислотных последовательностей показана эволюционная взаимосвязь между пероксидазами дикранума и других видов растений;

впервые изучены профили экспрессии ряда генов пероксидаз при различных стрессовых воздействиях на побеги мха *D. scoparium*.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

представлены обоснования использования *D. scoparium* в качестве удобной модели для изучения роли пероксидаз в стресс-реакциях 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, для 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.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

В работе корректно использовались классические и современные методы и подходы физиологии растений, биохимии и молекулярной биологии. Полученные данные обработаны статистически, а выводы обоснованы. Интерпретация экспериментальных результатов учитывает данные, полученные ранее другими исследователями по рассматриваемой тематике.

Личный вклад соискателя состоит в: непосредственном его участии в составлении плана исследования. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора и на данных, полученных при его непосредственном участии. Эксперименты по очистке белков и определению образования гидроксильного радикала проведены совместно с к.б.н. Викторовой Л.В. и к.б.н. Трифионовой Т.В. (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН). Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и руководителем работы. Автор принимал личное участие в апробации результатов работы.

В ходе защиты диссертации были высказаны критические замечания, относительно возможного исследования пероксидаз на разных этапах развития мхов и их сравнения с пероксидазами сосудистых растений. По представленным данным были заданы следующие вопросы:

- ✓ Чем обусловлен выбор мха *D. scoparium* как объекта исследования?
- ✓ В чем особенность пероксидаз мхов по сравнению с пероксидазами сосудистых растений?
- ✓ Как определялась активность пероксидазы и в какой части клетки выявлена максимальная активность пероксидаз III класса и аскорбатпероксидаз?

- ✓ Возможность молекулярного клонирования референсных белков и проверка их активности.
- ✓ На чем основан анализ и интерпретация данных по вторичной и третичной структуре ферментов?

Соискатель Онеле А.О. согласился с замечаниями, ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию. Мох *D. scoparium* был выбран в качестве объекта исследования, так как среди совместно произрастающих мхов обладает наивысшей пероксидазной активностью, широко распространен на планете и, согласно классификации мхов по устойчивости к обезвоживанию, относится к группе наиболее устойчивых мхов. Особенность пероксидаз мхов заключается в их высокой устойчивости и термостабильности по сравнению с пероксидазами высших сосудистых растений. Активность пероксидазы III класса определялась по окислению *o*-дианизидина в присутствии H_2O_2 , НАДН как восстановитель необходим для переключения пероксидазы с анти-на прооксидантную активность, образование супероксидного анион-радикала связано с превращениями гемового железа в активном центре пероксидазы. Было определено, что активность пероксидаз выше внутри клетки, чем в апопласте. Третичные модели пероксидаз были получены *in silico*. Модели пероксидаз III класса дикранума построены на основании пероксидаз из редиса и зерна пшеницы, а аскарбатпероксидаза - на основании аскарбатпероксидазы из соевых бобов. Для верификации идентифицированных пероксидаз III класса были клонированы DsPOD2 и DsPOD6 с самой высокой гомологией к пероксидазам *Physcomitrium patens*. Анализ секвенированных последовательностей показал высокую гомологию с пероксидазами других растений. На основании вторичной и третичной структуры было определено, что белки пероксидаз в основном содержат α -спирали и неструктурированные петли. В аскарбатпероксидазах полностью отсутствует β -поворот, что может негативно влиять на стабильность белка. При анализе третичной структуры пероксидазы III класса обнаружены

вариации в сворачивании белков между некоторыми пероксидазами дикранума. Возможно, что эти расхождения могут вносить вклад в каталитическую активность фермента. Анализ третичной структуры аскорбатпероксидазы дикранума показал высокое сходство со структурами аскорбатпероксидаз других мхов, что указывает на высокую консервативность этих белков.

На заседании 30 марта 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Онеле Алфреду Обинна ученую степень кандидата биологических наук за идентификацию и анализ ранее не открытых генов пероксидаз мха *D. scoparium* и получение оригинальных данных о вовлечении пероксидаз в стрессовые реакции мха, что имеет важное значение для понимания формирования эволюционных механизмов стресс-толерантности несосудистых растений.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 7 докторов наук по научной специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений (биологические науки), участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за - 14, против - 1, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель диссертационного совета,
академик РАН

Гречкин Александр Николаевич

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Пономарева Анастасия Анатольевна

31.03.2022 г.