

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Альбины Гарифулловны СУЛКАРНАЕВОЙ «Состав стеринов и активность генов C24-стерин метилтрансферазы *Triticum aestivum* при стрессе», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Одна из наиболее изучаемых проблем современной физиологии растений – выяснение молекулярных механизмов устойчивости растений к гипотермии. Многолетний повышенный интерес к исследованиям в этой области объясняется тем, что поиск ответов на теоретические вопросы самым непосредственным образом сопрягается с решением экономических задач. Так, низкотемпературный стресс негативно влияет на рост растений, ограничивая их географическое распространение и снижая продуктивность. В связи с этим большое значение приобретают знания о механизмах устойчивости, которые необходимы для создания новых устойчивых сортов, тем более что методы классической селекции, направленные на повышение устойчивости к гипотермии растений, в частности, пшеницы, ставших объектом исследования А.Г. Сулкарнаевой, длительны и трудоёмки, что затрудняет получение желаемого результата. Несмотря на усилия, предпринимаемые мировым научным сообществом, успехи в создании генно-инженерными методами устойчивых к низким температурам сортов сельскохозяйственных растений весьма скромны. Прежде всего, это связано с недостатком фундаментальных знаний о механизмах, лежащих в основе устойчивости растений к гипотермии.

Энергичные исследования в этом направлении, проводимые в течение двух последних десятилетий, позволили установить, что растения проявляют способность адаптироваться и переживать стресс посредством изменения экспрессии сотен структурных и регуляторных генов, изменения состава низкомолекулярных осмолитов, при помощи изменения уровня активных форм кислорода (АФК) и активности ферментов, утилизирующих АФК. Предложена гипотеза, согласно которой первичная роль в способности растений переносить гипотермию отводится мембранным липидам, в частности, их свойству фазовых переходов в зависимости от температуры окружающей среды. При действии низких температур мембраны становятся неспособными поддерживать ионные градиенты, клеточный метаболизм становится разобщённым, что ведёт к гибели клетки и всего организма.

Несмотря на очевидные успехи, остаётся много нерешённых вопросов. Один из них – вопрос о том, какие механизмы обеспечивают связь между восприятием и передачей температурного сигнала и проявлением адаптационного синдрома. Хотя сведения о рецепторах/сенсорах температурного сигнала у растений отсутствуют, принимается, что в передачу низкотемпературного сигнала вовлечена сложно организованная сигнальная сеть, компоненты которой инициируют и контролируют клеточные и метаболические изменения. Хотя «личность» и точные функции многих компонентов этой сети пока не ясны, предполагается, что липиды мембран, в частности липиды плазмалеммы, могут быть вовлечены в передачу холодового сигнала. Более того, глицеролипиды (главным образом фосфолипиды), сфинголипиды и стерины – три основных класса липидов плазмалеммы, которые определяют не только организацию, но и функционирование плазмалеммы как при нормальных условиях, так и при действии стрессоров разной природы.

Подчеркну, что информация о молекулярных событиях, сопровождающих гипотермию, которая оказалась в центре внимания А.Г. Сулкарнаевой, получена, главным образом, для *Arabidopsis thaliana*, причём всего лишь для ограниченного числа экотипов, которых у *A. thaliana* насчитывается несколько сотен (The Arabidopsis Information Resource). Между тем, за пределами арабидопсисной модели работ по тематике, сходной с тематикой рассматриваемой диссертации, практически нет. Это, по моему мнению, указывает на актуальность диссертационной работы Альбины Гарифулловны Сулкарнаевой. В этой работе решены задачи, которые позволяют заключить, что стерины и гликоцерамиды – те типичные для растений компоненты клеточных мембран, с образованием которых, по всей вероятности, связана повышенная (по сравнению с клетками животных) температурная устойчивость, обеспечивающая осуществление связанных с мембранами биологических процессов. Это, в свою очередь, даёт растениям возможность избежать гибели в случае существенных колебаний температуры для поддержания их нормального роста и развития.

Изложенная на 157 машинописных страницах диссертационная работа состоит из Введения, которое отвечает всем формальным требованиям, и трёх глав: Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты и их обсуждение. Значимость полученных экспериментальных данных подчеркнута диссертантом в Заключение. Результаты диссертационной работы достаточно полно и чётко отражены в пяти выводах. Список источников, цитируемых в диссертации, включает 331 наименование, из которых 305 – иностранных. Имеется также Приложение, где представлены результаты проведённого диссертантом биоинформатического анализа. Изложенный в диссертации материал иллюстрируют 33 рисунка и 13 таблиц.

Первая глава диссертации посвящена обзору литературы (41 страница, 12 рисунков) и включает, в широком смысле, анализ современного состояния исследований стеринов растений. В основе этой части диссертационной работы – детальный анализ достижений современной биологии, в частности, молекулярной биологии, физиологии растений и биохимии, которые служили обоснованием разработки методов и подходов для решения сформулированных диссертантом задач и достижения цели работы. Мне импонирует, что завершает обзор литературы Заключение, в котором в концентрированном виде суммированы сведения, изложенные в обзоре.

Стиль, в котором написан обзор литературы, безусловно, свидетельствует об аналитических способностях соискателя и её зоркости к деталям, которые касаются особенностей тематики исследования. Подчёркивая аналогии между стеринами объектов нерастительного происхождения и растений, А.Г. Сулкарнаева обозначает круг тех вопросов, которые у растений всё ещё мало исследованы. Вместе с тем, замечу, что в обзоре литературы имеется много деталей, которые в следующих главах «не отовариваются» собственными данными соискателя. Это с интересом читается, но хотелось бы видеть соображения автора о том, почему именно предпринятые ею эксперименты – предпочтительный путь к достижению цели работы.

Надеюсь, А.Г. Сулкарнаева согласится, что сейчас в литературе имеется некоторая неоднозначность в использовании таких терминов, как «микродомены», «наноомены», «липидные рафты», «детергент-устойчивые мембраны». В связи с этим, прочитав обзор литературы, хотелось бы разобраться, найден ли некий консенсус, или иными словами, получить ответ на вопрос, можно ли на основании современных данных считать, что, во-первых, эти термины взаимозаменяемы, во-вторых, насколько убедительно показано

наличие в плазмалемме клеток растений мембранных рафтов, сколько-нибудь аналогичных мембранам клеток животных.

Повторю, что содержание первой главы диссертационной работы указывает на зрелое отношение автора к предмету своего исследования. Кроме того, А.Г. Сулкарнаева демонстрирует потенциал к обобщению и логичному изложению имеющегося материала. Проведённый анализ литературы показывает также способность диссертанта адекватно оценивать имеющиеся в литературе сведения.

Во второй главе (16 страниц, 1 рисунок, 3 таблицы) диссертантом описаны объект исследования и методы, с привлечением которых выполнены эксперименты. Для решения поставленных задач автором использованы современные методические приёмы, подчеркивающие высокий уровень экспериментальной работы, выполненной диссертантом.

Объектом исследования служили выращенные на свету 4-дневные проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казанская юбилейная. Поскольку уже из названия работы ясно, что проростки будут подвергаться стрессу, то стоило бы написать о чувствительности выбранного сорта к гипотермии, если, конечно, она известна. Если диссертант рассматривает возможность использования полученных в работе данных «при оценке стрессовой устойчивости растений» (стр. 10), то такая информация позволила бы понять, имеются ли различия в механизмах устойчивости у отличающихся по этому параметру сортов. Действительно, в литературе сведения такого рода имеются, например, для различных по морозостойкости сортов люцерны (*Medicago sativa* L.).

Подчеркну, что все методы, использованные в работе, адекватны поставленным задачам, а методические протоколы изложены А.Г. Сулкарнаевой чётко и достаточно точно. Однако и в такой добротной работе не обошлось без неточностей. Автор, например, пишет, что «проростки пшеницы помещали на 1-12 ч на +4° С» (стр. 54), тогда как проростки выдерживали при указанной температуре в течение 1 и/или 12 ч. Хорошо бы добавить, происходила ли обработка на свету или в темноте. Говоря о получении бесклеточных экстрактов, лучше использовать не тыс. об/мин, а ускорение (g) (стр. 58, 60, 64). Неплохо было бы сообщить, чему соответствует условная единица активности пероксидазы (стр. 59), сколько тотальной РНК содержалось в 2 мкл (стр. 61), а также указать какой алгоритм BLAST был использован при поиске и сопоставлении целевой аминокислотной последовательности ТА-МТ (AAB37769.1) с другими белками – blastp или tblastx (стр. 69).

Результаты исследований и их обсуждение изложены в третьей главе диссертации (43 страницы, 20 рисунков, 10 таблиц). Прежде чем перейти к рассмотрению этой центральной главы диссертации, считаю необходимым подчеркнуть следующее. В целом, свойства биологических мембран можно рассматривать с двух точек зрения. Во-первых, как сложно организованную «систему», которая отвечает на поступающий сигнал как единое целое, во-вторых, как совокупность интегрированных индивидуальных липидов разных классов и белков, которые способны по-разному реагировать со своим микроокружением.

Представляя результаты своей диссертационной работы и обсуждая их, А.Г. Сулкарнаева, скорее, придерживается первой точки зрения. Логика её исследования ясна и основана на том, что в клетках эукариот стерины регулируют биологические процессы и поддерживают доменную структуру мембран клеток. Соискатель показывает, что в отличие от животных и грибов, у которых основными стеринами является холестерин и

эргостерин соответственно, и в корнях, и в листьях растений пшеницы идентифицируются одни и те же молекулярные виды стеринов, а именно:  $\beta$ -ситостерин, стигмастерин, кампестерин и холестерин. В корнях и листьях проростков пшеницы их соотношение сходно, но не тождественно, тогда как общее содержание стеринов в 3 раза выше в листьях, чем в корнях (рис. 23, таблица 10). То есть, имеющееся в литературе соображение об органной специфичности молекулярных видов стеринов у растений пшеницы не «работает».

Иная ситуация имеет место после экспонирования проростков пшеницы при 4° С. А.Г. Сулкарнаева показывает, что только после 1-часового действия фактора и в корнях, и в листьях происходят изменения общего содержания стеринов (рис. 23), соотношения 24-метил-/этилстеринов (таблица 11), а также по-разному меняется соотношение молекулярных видов стеринов (таблица 10). Если стерин «защищает» растения от гипотермии, то, вероятно, происходит это в первые 12 часов после снижения температуры. По-моему, А.Г. Сулкарнаевой стоило бы сформулировать свои соображения по этому поводу. Подчеркну, что исследование временной зависимости не только следует продолжить, но и развернуть в сторону выяснения пространственного распределения молекулярных видов стеринов.

Сегодня ни для кого не секрет, что биологи растений используют методические приёмы, зарекомендовавшие себя при изучении клеток животных и грибов. Действительно, для объектов нерастительного происхождения показано, что ингибиторы биосинтеза стеринов и сфинголипидов могут быть теми инструментами, при помощи которых можно дискриминировать эффекты, связанные с «разбавлением» структурных стеринов, и эффекты, вызванные снижением уровня стероидных гормонов. Для растений, понятно, речь идёт о brassinosterоидах.

В ходе работы А.Г. Сулкарнаевой, конечно, было бы «безопаснее» использовать растения-мутанты с нарушенным биосинтезом стеринов. Однако выбранный объект лишил её такой возможности. Тем не менее, вполне приемлемый выход нашёлся. Выразилось это в применении полиенового антибиотика нистатина и циклического олигосахарида метил- $\beta$ -циклодесктрина (М $\beta$ CD). Об этих фармакологических агентах известно как о веществах, способных уменьшать содержание стеринов в клетках. Хотя механизмы, обеспечивающие связывание нистатина и М $\beta$ CD со стеринами различны, при помощи такого подхода А.Г. Сулкарнаева показала, что в корнях проростков пшеницы, обработанных нистатином и/или М $\beta$ CD, уменьшается содержание основных молекулярных видов стеринов и повышается уровень гликоцерамидов (рис. 16).

Здесь необходимо привлечь внимание к экспериментам, результаты которых представлены в таблице 4. Они произвели на меня сильное впечатление, за которым последовало желание уточнить следующее. Из литературы известно, что о последствиях связывания М $\beta$ CD со стеринами зависит от времени обработки ткани М $\beta$ CD. Если обработка М $\beta$ CD продолжалась не более 60 минут, то наблюдалась интернализация стерин-зависимых белков плазмалеммы, тогда как при более длительной обработке интернализированные белки обнаруживались в превакюлярном компартменте. Эти данные позволяют допустить, что обработка М $\beta$ CD индуцировала эндоцитоз. В связи с этим хотелось бы узнать, как долго корни проростков пшеницы обрабатывали М $\beta$ CD? Таким образом, вероятно, сама того не ожидая, А.Г. Сулкарнаева получила данные, которые могут стать основанием для исследования микродомен-ассоциированного эндоцитоза наряду с клатрин-зависимым эндоцитозом.

Далее диссертант вполне резонно озадачивается вопросом о физиологических последствиях влияния стерин-связывающих агентов на клетки корня. И в этих экспериментах проявилась «разноликость» нистатина и МβCD. А.Г. Сулкарнаева показала, что в отличие от МβCD токсичность нистатина есть результат истощения стеринов в сочетании с образованием пор в мембранах (таблица 5). То есть, при обработке нистатином создавались предпосылки возникновения в клетках корня окислительного стресса (таблица 6).

Действительно, А.Г. Сулкарнаева обнаружила, что в ответ на обработку нистатином в корнях проростков пшеницы происходили изменения, аналогичные тем, что имеют место при окислительном стрессе. Росло содержание пероксида водорода и транскрипция гена *TaPOX37*, который кодирует 37-кДа пероксидазу (таблица 6); развивалась аутофагия, выявленная на клеточном уровне (рис. 18), а также по изменению транскрипции генов, кодирующих аутофагические белки (рис. 19).

Напротив, негативные последствия истощения стеринов при действии МβCD проявлялись лишь при гипотермии (рис. 21, таблица 7).

На основании совокупности полученных данных диссертант вполне обосновано заключает, что при гипотермии стерин участвует в предотвращении развития окислительного стресса и стабилизации мембран в клетках корней пшеницы.

Нельзя не согласиться с автором работы, что биосинтез стеринов у растений – «многоступенчатый процесс, характеризующийся наличием множества альтернативных путей». Отсюда очевидно, что активность различных ветвей этого пути можно регулировать, а содержание основных стеринов растений – контролировать. Следовательно, понятно, что, разбираясь в вопросе о физиологической роли стеринов, без сведений о том, как у растений пшеницы осуществляется биосинтез стеринов не обойтись. Вспоминая арабидопсисную модель, скажу, что использование мутантов с повреждениями в генах, кодирующих ферменты биосинтеза стеринов, оказалось крайне информативным. Стало известно, что у растений S-аденозил-L-зависимая C24-стерин метилтрансфераза (SMT) – ключевой фермент биосинтеза стеринов. Поскольку в базе данных NCBI А.Г. Сулкарнаева нашла аминокислотную последовательность лишь одной SMT пшеницы – TA-MT, AAB37769.1. Понятно, что у неё не было иного пути, как секвенировать ген пшеницы, изучить его структуру и поискать в промоторах чувствительные к стрессу *cis*-элементы.

Учитывая сложность организации генома пшеницы, нельзя не заметить, что диссертант преуспела, решая эти задачи своей диссертационной работы. Она впервые идентифицировала три копии гомеологичных генов *TaSMT1*, которые лежат на хромосомах А, В, D гексаплоидного генома *T. aestivum* – *TaSMT1-5A*, *TaSMT1-4B*, *TaSMT1-4D*, а кодирующие последовательности этих генов имеют высокую степень сходства.

Имея в руках эту информацию, диссертант проверила, изменяется ли при гипотермии в листьях и корнях проростков пшеницы транскрипция перечисленных генов. Ей удалось показать, что экспрессия этих генов не только «чувствительна» к пониженной температуре, но и различна в листьях и корнях проростков. В отсутствие стресса *TaSMT1-5A* и *TaSMT1-4D* экспрессируются в обоих органах, но характер изменений их транскрипции отличается в ответ на пониженную температуру. Так, экспрессия *TaSMT1-4D* растёт и в корнях, и в листьях с увеличением продолжительности действия стрессора,

тогда как транскрипция *TaSMT1-5A* не меняется в корнях, но имеет трудно объяснимый характер экспрессии в листьях (рис. 32).

Чтобы разобраться в этой ситуации диссертант приходит к необходимости анализа промоторов этих генов. Здесь снова с удовольствием скажу, что А.Г. Сулкарнаева впервые секвенировала промоторные последовательности генов *TaSMT1* и выявила *cis*-элементы, чувствительные к стрессу (Приложение, таблица 1). Эти результаты заслуживают повышенного внимания. Однако пока требуется определённая осторожность в рассуждениях о том, какие из этих *cis*-элементов определяют дифференциальный характер экспрессии *TaSMT1* в проростках пшеницы при холодовом стрессе.

Чтобы получить эти приоритетные данные, А.Г. Сулкарнаева провела объёмный *in silico* анализ. Однако не во всех случаях представление результатов анализа и интерпретация результатов представляется бесспорной. Так,

– хотелось бы спросить диссертанта, при помощи какого биоинформатического ресурса установлено, что белок ТА-МТ (AAB37769.1) является трансмембранным? Скорее, эти сведения из литературы, тогда нужна ссылка.

– в подписи к рис. 26А стоило бы сообщить, какой алгоритм использован при построении филогенетического дерева: метод максимального правдоподобия, метод ближайших соседей или что-то другое. Неплохо было бы и обсудить результаты филогенетического анализа.

– поскольку цифры об идентичности аминокислотных последовательностей в таблице 13 отличаются от тех, что даёт BLAST NCBI, стоило бы написать, какой ресурс был использован.

– на рис. 27 изображены консервативные участки первичной последовательности белка *TaSMT1*. Рассматривая этот рисунок, мне не удалось увидеть, что *SMT* содержат С-концевой сигнальный домен, который может осуществлять адресную доставку белка в ЭПР.

Итоги экспериментальной части диссертационной работы подведены в Заключение. Здесь суммируются полученные А.Г. Сулкарнаевой результаты. Немногословность заключения представляется вполне уместной, так как в предыдущей главе полученные результаты обстоятельно обсуждены.

Завершают диссертацию пять выводов, в которых отражена теоретическая значимость исследования. Выводы сформулированы конкретно и ясно; они вполне согласуются с задачами, стоявшими перед диссертантом, и основаны на результатах большого числа проведённых экспериментов.

Следует специально подчеркнуть, что все главы диссертации написаны чётко, логично и хорошим языком. Описание результатов исследования сопровождаются наглядными аккуратно выполненными рисунками, что позволяет по заслугам оценить качество работы. Отмечу, тем не менее, такую погрешность редакционного плана, как использование ссылок на собственные статьи как на литературные источники, тогда как, по существу, эти работы представлены в качестве публикаций по теме диссертации.

Итак, А.Г. Сулкарнаева представила оригинальное, хорошо продуманное научно-квалификационное исследование, многие результаты которого получены впервые. Поставленные в работе задачи, способы их экспериментального решения, полученные результаты и уровень их теоретического осмысления соответствуют современному уровню исследований в выбранной области. Работа выполнена на высоком методическом и теоретическом уровне, достоверность результатов не вызывает сомнений. Выводы автора

вполне корректны и аргументированы результатами экспериментов. Полученные в работе новые данные, применённые методические подходы и приёмы могут быть успешно использованы в научных учреждениях биологического профиля.

По результатам диссертационного исследования имеются три статьи, которые опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Основные положения диссертации представлены на научных конференциях как российских, так и международных. Автореферат адекватно отражает содержание экспериментальной части работы.

По объёму выполненных исследований, актуальности полученных результатов, а также по формальным параметрам, диссертационная работа А.Г. Сулкарнаевой «Состав стеринов и активность генов C24-стерин метилтрансферазы *Triticum aestivum* при стрессе» отвечает критериям, сформулированным в Положении о порядке присуждения учёных степеней.

Считаю, что автор работы Альбина Гарифулловна Сулкарнаева заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Доктор биологических наук  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории молекулярных основ  
внутриклеточной регуляции  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки  
Института физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук

Галина Викторовна Новикова  
19.05.2016 г.

Контактные данные официального оппонента

Почтовый адрес: 127276, гор. Москва, ул. Ботаническая, 35. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Телефон: +7 (499)231-83-68.

Адрес электронной почты: gv.novikova@mail.ru



Новикова Г. В.

Тимова Е. Г.