

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Школы естественных наук
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего
профессионального образования
«Дальневосточный федеральный университет»,
академик А.В.Адрианов



_____» апреля _____ 2016 г.

Отзыв ведущей организации

о диссертационной работе **СУЛКАРНАЕВОЙ АЛЬБИНЫ ГАРИФУЛЛОВНЫ**
«Состав стеринов и активность генов C24-стерин метилтрансферазы *Triticum Aestivum* при стрессе», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - физиология и биохимия растений

Актуальность темы диссертации и научная новизна полученных результатов. Клеточные мембраны содержат разнообразные липиды, состав которых изменяется под действием факторов внешней среды, обеспечивая приспособление организма к новым условиям существования. Как известно, стеринны наряду с фосфо- и гликолипидами являются мембранообразующими липидами. В состав стериннов растений (фитостериннов) в отличие от стериннов животных входят несколько C24-стериннов, которые, являясь основными стеринами растений, обеспечивают необходимую стабильность их клеточных мембран. В последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о регуляторной функции стериннов. Поэтому нарушения биосинтеза основных фитостериннов может приводить к различным дисфункциям растений. Однако молекулярные механизмы вовлечения фитостериннов в процесс адаптации растений к различным изменениям условий существования мало изучен, что препятствует выработке представлений о взаимосвязи структуры и функции фитостериннов, несомненно, имеющих теоретическое и прикладное значение. В связи с этим, полученные автором результаты оригинальны и приоритетны, то есть отличаются научной новизной.

Практическая ценность. Исследование расширяет недостаточно разработанные или полностью отсутствующие в науке представления о роли стериннов в структуре и функциях биологических мембран растений в целом и, в частности, такой ценной культуры, как пшеница, в норме и при стрессе. Полученные данные могут быть использованы при оценке стрессовой устойчивости и селекции растений в биологических, сельскохозяйственных и биотехнологических научных учреждениях, а также для подготовки студентов и аспирантов университетов в области молекулярной биологии, биохимии и физиологии растений.

Достоверность и обоснованность полученных результатов и выводов. Сделанный автором обзор состояния проблемы изучения стериннов растений и участия C24-стериннов и метилтрансфераз, ответственных за их биосинтез, в адаптации растений позволил диссертанту обосновать выбор показателей и методов для проведения собственных исследований. Объем исследований является достаточным для получения достоверных результатов и выводов. Достоверность результатов обеспечена использованием адекватных современных методов и математико-статистической обработкой данных. Биоинформатический анализ нуклеотидных и аминокислотных

последовательностей проведен с использованием интернет-ресурсов и различных программ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 153 страницах, иллюстрирована 33 рисунками и содержит 12 таблиц. Она включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы, содержащий 331 источник. Дополнительный материал на 4 страницах приведен автором в Приложении, включающем 2 рисунка и 1 таблицу.

Во **Введении** автор обосновывает актуальность темы, цель и задачи исследования, научная новизна и научно-практическую значимость работы; приводятся данные о личном вкладе соискателя, положения, выносимые на защиту, данные об апробации работы и публикациях автора, а также структура и объем диссертации.

В **первой главе «Обзор литературы»**, состоящей из 5 разделов, дан анализ современных данных по обсуждаемой проблеме стресс-индуцированных изменений в биосинтезе растительных стеридов и роли в этом процессе С24-стеридов и метилтрансфераз, ответственных за их биосинтез. Он представляет большой интерес для широкого круга специалистов, поскольку в нем впервые за последние десятилетия систематизированы и обобщены результаты исследований в этой области. В «Обзоре литературы» приведена характеристика структуры и функций растительных стеридов (фитостеридов) и их преобладающей группы - 24-метил- и этилстеридов, отмечается многообразие фитостеридов и особенности их биосинтеза по сравнению с биосинтезом стеридов у грибов и животных. Дается представление о методическом подходе, часто применяемом для исследования роли стеридов в функционировании мембран, метаболизма клетки и организма в целом с использованием стерид-связывающих агентов таких, как полиеновый антибиотик нистатин и макроциклический олигосахарид метил- β -циклодекстрин ($M\beta CD$). Подробно описана роль С24-стерид метилтрансфераз (SMT1 и SMT2) в биосинтезе главных фитостеридов, соотношение которых может оказывать влияние на рост, развитие и стрессовые ответы растений. Проведен анализ структуры и транскрипционной активности генов SMT, молекулярные механизмы регуляции экспрессии которых начали активно изучаться сравнительно недавно. В заключении «Обзора литературы» подчеркивается, что, несмотря на ключевую роль SMT в биосинтезе растительных стеридов, гены, кодирующие эти ферменты, охарактеризованы не для всех видов растений, а информация о структуре и профиле экспрессии генов SMT весьма ограничена. Все разделы логично связаны между собой. Обзор написан хорошим языком и легко читается.

Материалы и методы, использованные в работе, многообразны, современны и адекватны поставленным задачам. Всего описано более 20 различных методов: от методов анализа липидов, функционального состояния мембран и окислительно-восстановительного статуса растений, конфокальной микроскопии до методов молекулярной биологии и биоинформатики, что говорит о высоком уровне квалификации и большой методической работе соискателя.

Результаты и их обсуждение изложены в 3 разделах (кстати, допущена ошибка в нумерации раздела 3.3. по тексту). Описание результатов логично начинается с результатов идентификации стеридов в проростках пшеницы с помощью хромато-масс-спектрометрии и изучения роли стеридов в функционировании мембран путем искусственной модификации мембран стерид-связывающими агентами. Методом динамического светорассеивания показано, что $M\beta CD$ способен образовывать устойчивые комплексы с растительными стеринами. Этот вывод подтверждается различием электрокинетического потенциала частиц в индивидуальных и смешанных растворах β -ситостерина и $M\beta CD$. Показано, что связывание стеридов с нистатином и $M\beta CD$ сопровождается значительным уменьшением содержания основных молекулярных видов стеридов и существенным увеличением уровня гликоцерамидов (ГлЦер) в клетках корней

пшеницы. Полученные данные согласуются с данными, ранее полученными с использованием других видов растений. Одновременно отмечено увеличение проницаемости плазмалеммы для ионов калия при действии нистатина в отличие от *MβCD*. Показано, что увеличение проницаемости мембран клеток корней проростков пшеницы, вызванное действием нистатина, приводит к повышению содержания H_2O_2 и относительного уровня экспрессии генов пероксидаз *TaPOX*. Автор справедливо полагает, что пероксидазы могут вносить вклад как в детоксикацию, как и образование АФК при действии нистатина, вызывающего в клетках окислительный стресс. Выявленное образование аутофагосом при действии нистатина подтверждает развитие окислительного стресса в клетках корней пшеницы. *MβCD* в отличие от нистатина не оказывал влияния на содержание H_2O_2 и образование аутофагосом. Однако автор не ограничился визуальным наблюдением за образованием аутофагосом. Исследование молекулярных механизмов этого процесса показало, что экспрессия гена одного из ключевых белков, ATG4 - редокс-сенсора, участвующего в формировании аутофагосом, незначительно изменялось под действием нистатина, что коррелировало с его небольшим эффектом на жизнеспособность клеток. Однако при увеличении концентрации нистатина, вызывающий образование пор в мембранах, явно проявляет токсические свойства, тогда как токсичность *MβCD* проявлялась только при совместном действии с другими стрессами. Подчеркивается различное влияние нистатина и *MβCD* на проницаемость мембран, дыхательную активность клеток корней, содержание H_2O_2 , активность антиоксидантного фермента, развитие аутофагии и жизнеспособность клеток. В целом, полученные данные об эффектах стерин-связывающих агентов явно свидетельствуют о важности поддержания уровня стерина для жизнедеятельности растения.

Второй раздел посвящен осуждению результатов исследования эффектов низкой положительной температуры на проростки пшеницы. Показано, что холодовой стресс приводит к увеличению проницаемости мембран клеток, повышению редокс-статуса и индукции аутофагической деградации в корнях пшеницы, в отличие от листьев растения, где не наблюдалось значительных изменений этих параметров. По предположению автора, различный эффект холодowego стресса в разных частях растения состоит в том, что в корнях, в отличие от листьев, не происходит адекватных адаптационных изменений в содержании и жирнокислотном составе липидов, что может приводить к нарушению целостности клеточных мембран и интенсификации процессов ПОЛ. Далее это предположение подтверждается данными по исследованию стерина, гликолипидов, фосфолипидов в корнях и листьях проростков пшеницы.

В третьем разделе дается характеристика С24-стерин метилтрансферазы пшеницы (TA-MT), биоинформатический анализ которой показал более высокую гомологию с SMT1, особенно с SMT1 других злаковых, чем с SMT2, а также наличие трех стерин-связывающих сайта и S-аденозил-L-метионин-связывающий сайта. В результате анализа было построено филогенетическое древо. Поиск возможных изоформ генов *SMT* пшеницы. Особый интерес представляют данные по идентификации и характеристике гомеологичных генов пшеницы, выявление и исследование которых представляет интерес как с эволюционной, так и с генетико-селекционной точки зрения. Автором впервые были выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательности трех генов, кодирующих С24-стерин метилтрансферазу. С помощью биоинформатического анализа показано, что они являются гомеологичными генами, структура которых соответствует структуре гомеологичных генов высших растений, что проиллюстрировано построенным филогенетическим древом генов. Анализ экспрессии этих генов в корнях и листьях проростков пшеницы при действии низкой положительной температуры выявил различную экспрессию генов *TaSMT1* как в различных органах проростков пшеницы, так и в ответ на действие низкой положительной температуры. Амплифицированы промоторные области трех гомеологичных генов *TaSMT1* пшеницы, в которых обнаружены стресс-чувствительные *cis*-элементы, индуцируемые светом, засухой,

низкими и высокими температурами и различными фитогормонами, что позволило соискателю предположить многофакторность регуляции данного белка пшеницы и его участие в стрессовом ответе. Учитывая необыкновенную сложность и неполную изученность генома пшеницы, от автора потребовалось мастерское владение теоретическими знаниями и методическими приемами современной молекулярной биологии. Весь комплекс данных, полученный автором с помощью биохимических и молекулярно-генетических подходов, меняют сложившееся представление о стеринах лишь как о структурных элементах мембран и способствуют пониманию важной регуляторной функции этих мембранных липидов, что резюмируется в Заключение, подводящем краткий итог проделанной разпоплановой и тщательно спланированной работы. Особенно хочется отметить логичность и рациональность в изложении Заключения, помогающего правильно расставить акценты в обширном массиве полученных автором экспериментальных данных.

По теме диссертации опубликовано 16 работ, из них 7 статей, опубликованных в журналах, определенных списком ВАК, и 11 тезисов докладов. Результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на 11 конференциях различного уровня, от международных до региональных.

Представленные выводы конкретны, правильно сформулированы и хорошо аргументированы, они отражают полученные экспериментальные результаты и имеют полное теоретическое обоснование. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы, кратко резюмирует ее основные положения, достаточно полно описывает основные этапы проведенных исследований и в целом оставляет хорошее впечатление.

Данная диссертационная работа содержит достаточное количество экспериментальных данных и большой иллюстративный материал. Она написана грамотным научным языком и оформлена в соответствии со всеми требованиями ВАК. Достоверность представленных в работе результатов не вызывает сомнений. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Грамотная постановка соискателем целей и задач работы, глубокая проработка и анализ литературных данных по теме диссертации, применение в исследовании достаточно широкого спектра методов и протоколов, а также интерпретация собственных результатов свидетельствуют о высоком экспериментальном и профессиональном уровне соискателя.

Однако, несмотря на высокий уровень диссертационной работы, нельзя не высказать ряд **вопросов и замечаний**:

1. При описании метода экстракции липидов автор, ссылаясь на работу Kotlova et al., 2009, приводит следующую последовательность процедур: гомогенизация → инактивация ферментов, что прямо противоположно логичной последовательности этих процедур, указанной в ссылке. Вероятно, допущена ошибка в тексте диссертации (?). Кроме того, длительное нагревание в течение 30 мин при 70 °С при инактивации ферментов может приводить к деградации части фосфолипидов. Обычно для этих целей достаточно прокипятить растительную ткань в течение всего лишь ~3 мин.

2. На хроматограмме (рис. 13) отсутствует фосфатидилглицерин (ФГ), хотя далее по тексту становится ясно, что он присутствует в проростках пшеницы в заметных количествах.

3. На С. 89. Раздел 3.2.2. Какой фазовый переход имеется в виду в следующем предложении: «Адаптивные возможности растений при низкотемпературном стрессе в значительной степени зависят от того, насколько они способны ... предотвращать фазовый переход липидов»? Правильнее все-таки писать в этом случае об адаптивном значении поддержания вязкости липидного матрикса на оптимальном для функционирования мембран уровне.

4. Там же. Жирные кислоты не относятся к мезогенам, то есть не способны формировать жидкокристаллическую фазу. Речь, вероятно, идет о том, что фосфолипиды

с насыщенными жирнокислотными остатками переходят из жидкокристаллического состояния в состояние геля при более высокой температуре (а не быстрее), чем фосфолипиды, ацилированные ненасыщенными жирными кислотами.

Заключение

Диссертационная работа Сулкарнаевой А.Г. «Состав стеринов и активность генов С24-стерин метилтрансферазы *Triticum Aestivum* при стрессе» по теоретическому уровню, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости отвечает критериям, сформулированным в Разделе II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а автор работы, Сулкарнаева Альбина Гарифулловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - физиология и биохимия растений.

Диссертация и отзыв обсуждены на заседании кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Дальневосточный федеральный университет» (протокол №11 от 18 апреля 2016 г.).

Доктор биологических наук,
профессор кафедры биохимии,
микробиологии и биотехнологии
Школы естественных наук
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего
профессионального образования
«Дальневосточный федеральный университет»
sanina.nm@dvvfu.ru
690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8
Раб. тел. +7(423)257779

Н.М. Санина

Подпись Саниной Н.М. заверяю

Начальник отдела кадрового
делопроизводства ДВФУ

- 19 " 04 2016

