

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Сулкарнаевой Альбины Гарифулловны «Состав стеринов и активность генов С24-стерин метилтрансферазы *Triticum aestivum* при стрессе», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Диссертационная работа Сулкарнаевой А. Г. посвящена изучению роли стеринов – одного из ключевых структурных элементов клеточных мембран, в жизнедеятельности растений, а также стресс-индуцированным изменениям активности генов, ответственных за их синтез. Представленная диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 157 страницах и содержит 13 таблиц и 33 рисунка. Список литературы включает 331 источник, из которых 305 – иностранных.

Во **введении** автор доказывает актуальность выбранной им темы исследований, обращая внимание на то, что, несмотря на имеющуюся в литературе информацию о роли стеринов и их производных в жизнедеятельности растений, молекулярные механизмы вовлечения стеринов в стрессовые ответы растений остаются малоизученными. Например, не исследован вклад ключевых ферментов биосинтеза растительных стеринов в изменение соотношения различных видов стеринов в условиях стресса, а также стресс-индуцированные изменения активности генов, ответственных за синтез стеринов растительной клетки. Данное обстоятельство определило основные цели и задачи, поставленные диссертантом.

Цель и задачи работы сформулированы четко и понятно. Показана новизна, важная теоретическая и практическая значимость проведенных исследований. Необходимо также отметить широкую апробацию работы, основные результаты которой были представлены на конференциях разного уровня.

В защищаемых научных положениях Сулкарнаева А.Г. декларирует, что: 1. вовлечение стеринов в стрессовый ответ растительной клетки реализуется через изменение общего содержания стеринов, соотношения их молекулярных видов, соотношения стеринов с другими мембранными липидами. 2. Ген стеринового биосинтеза TaSMT1 представлен в геноме пшеницы в виде трех гомеологичных копий, которые характеризуются высокой степенью сходства кодирующих областей, существенными различиями в структуре промоторов, дифференциальной экспрессией при стрессе.

Глава 1 – «Обзор литературы», стр. 14-53, приведены сведения о химической структуре и многообразии молекулярных видов растительных стероидов, их функций в качестве компонентов мембран, описана роль стероидов в трансдукции сигнала, в росте и развитии растений, в стрессовом ответе растительных клеток. Проанализированы некоторые методические подходы, используемые при изучении роли стероидов во внутриклеточных процессах. Приведены современные сведения о биосинтезе растительных стероидов. Ключевым ферментом в биосинтезе стероидов, определяющим образование конечных продуктов синтеза, является С24-стероид метилтрансфераза (SMT). Показано, что данный фермент необходим для нормального роста и развития растений, и активность SMT меняется при действии различных стрессовых факторов. Завершает литературный обзор заключение, в котором автор делает вывод, что важным аспектом в изучении стероидов является исследование и анализ ферментов их биосинтеза, в частности, ключевого фермента биосинтеза – С24-стероид метилтрансферазы. Однако далеко не для всех видов растений охарактеризованы гены, кодирующие ферменты синтеза стероидов. Кроме того, весьма ограничена информация о структуре и профиле экспрессии генов SMT. Исходя из анализа литературных данных, автором были сформулированы основные цели и задачи диссертационной работы. Следует отметить, что литературный обзор написан с привлечением большого числа современных источников, основная часть проанализированных работ относится к периоду 2000 – 2015 г., причем большая часть источников представлена зарубежными публикациями. В целом литературный обзор демонстрирует глубокое знание современного состояния исследований по данной проблеме.

Глава 2 – «Материалы и методы исследования», стр. 54-69.

В данной главе приведены сведения об объекте исследования, в качестве которого использовали проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Казанская юбилейная». Описаны условия выращивания и основные физиолого-биохимические методы анализа, включая анализ липидов, размер (D_{eff}) и ζ -потенциал частиц стероид – связывающего агента М β СД и β -ситостерина, определение проницаемости мембраны для ионов и электролитов, окислительно-восстановительного статуса и жизнеспособности клеток. Подробно описаны молекулярные методы исследования: анализ уровня экспрессии генов, выделение ДНК растений и молекулярное клонирование участков целевых генов и т.д., а также

биоинформатический анализ для поиска и сравнения гомологичных последовательностей.

Статистическая обработка основана на использовании среднеарифметических значений и их стандартных отклонений по результатам 3-х биологических и 4-х аналитических повторностей с использованием t-критерия Стьюдента при $P \leq 0,05$, что является наиболее часто используемым подходом в определении достоверности полученных результатов исследования. Широкий спектр используемых аналитических методов свидетельствует о высокой квалификации диссертанта.

В качестве замечаний следует отметить, что на рис. 13 приведена хроматограмма общей липидной фракции, на которой обозначены только полярные глицеролипиды. Поскольку работа посвящена изучению стеринов, которые входят в состав нейтральных липидов, то следовало бы привести хроматограмму, позволяющую увидеть этот компонент общего пула липидов и который не виден на приведенном рисунке. **Второе замечание** – следовало бы обосновать выбор яровой пшеницы в качестве объекта исследования. В частности необходимо привести сведения о холодовой чувствительности выбранного объекта.

В главе 3 «Результаты и их обсуждение», стр. 70-112, представлены результаты исследований автора. Эта часть работы состоит из нескольких блоков. В первом блоке, озаглавленном как «Действие стерин-связывающих агентов М β CD и нистатина на корни проростков пшеницы», исследованы особенности действия двух, различных по химической природе, соединений на физиологическое и биохимическое состояние корней пшеницы. Одновременно с идентификацией молекулярных видов стеринов, присутствующих в проростках пшеницы и доказательством их химического строения показано, что нистатин и М β CD оказывают сходное действие на содержание отдельных липидных классов. Изучение влияния стерин-связывающих агентов на физиологические параметры клеток корней пшеницы показало, что, несмотря на сходство действия на липидный состав корней, нистатин и М β CD оказывают различное влияние на такие параметры, как проницаемость мембран для ионов калия, дыхательную активность клеток корней, содержание H₂O₂, активность антиоксидантного фермента, развитие аутофагии и жизнеспособность клеток.

Данные по увеличению содержания в клетках H₂O₂, изменению экспрессии генов пероксидаз убедительно доказывают, что при воздействии на корни проростков пшеницы антибиотика нистатина увеличивается проницаемость

мембран и индуцируется окислительный стресс. Развитие окислительного стресса в клетках сопровождается образованием аутофагосом и стимулированием экспрессию гена TaATG4, кодирующего редокс-регулируемый аутофагический белок ATG4. На основании полученных данных автор заключает, что стеринны участвуют в предотвращении развития окислительного стресса и стабилизации мембран в клетках корней пшеницы при действии холода, увеличивая адаптационные возможности растения при стрессе.

Замечания:

- 1) утверждение о сходном действии нистатина и МβCD на содержание отдельных липидных классов касается только липидов стеринового типа, поскольку данные о составе фосфолипидов, приведены только для одного из исследуемых агентов, а именно для МβCD (рис. 17);
- 2) поскольку выделение плазмалеммы (ПМ) не проводилось, то заключение о том, что нистатин и МβCD оказывают различное влияние на физиологические параметры, такие как проницаемость ПМ для ионов калия...» (стр. 82) не совсем корректно;
- 3) также некорректным выглядит заключение о дыхательной активности клеток корней при отсутствии соответствующих данных.

Во втором блоке приводятся данные о действии низкой положительной температуры на проростки пшеницы. В этой части работы наряду со стандартными методами определения изменений индекса мембранной стабильности и редокс-статуса в корнях и листьях пшеницы по уровню ПОЛ и содержанию H₂O₂, применены методы, позволяющие судить об активации процессов аутофагии и изменениям липидного состава. Скопление аутофагосом в виде точечных образований наблюдалось в цитоплазме по всему объему клетки. Индукция аутофагии при действии низкой положительной температуры была также подтверждена с помощью анализа активности маркерного гена аутофагии TaATG8. Таким образом, автором впервые показано, что в корнях проростков пшеницы, подвергнутых холодному стрессу, происходит индукция аутофагии, которая выполняет функцию защитного механизма для обезвреживания окисленных и поврежденных холодом макромолекул.

Что касается липидов, то наиболее важные, на наш взгляд, результаты связаны с выявленной автором закономерностью – органоспецифичным изменением соотношения молекулярных видов стеринов при кратковременном холодном стрессе, а именно соотношением содержания 24-метилстеринов к 24-этилстеринам, а также обратная зависимость между

содержанием стерина и ГлЦер. Изменения в количественном содержании глико- и фосфолипидов в клетках корней и листьев не новы, но еще раз подтвердили известный факт об участии полярных липидов – как главных структурных элементов мембран, в ответе на воздействие различного рода стрессоров.

Замечания:

1) Заявленный автором тезис о том, что изменение соотношения стерина/ГлЦер и стерина/ФЛ может влиять на функционирование мембран (стр. 90) не нашел реализации, поскольку данные о соотношении указанных липидов отсутствуют.

Следующий этап работы был связан с генетическим уровнем исследования. Диссертант предположил, что изменения стеринового профиля при стрессе обусловлены изменениями на генном уровне. Для проверки этого предположения подробно охарактеризована С24-стерин метилтрансфераза. С помощью биоинформатического анализа установлено, что С24-стерин метилтрансфераза 1 пшеницы (TaSMT1) имеет типичные консервативные последовательности, характерные для SMT1 других растений. Однако диссертантом были проведены эксперименты, в ходе которых выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательности трех генов TaSMT1 пшеницы. Было установлено, что гомеологичные гены пшеницы TaSMT1 расположены на длинных плечах хромосом 5AL, 4BL и 4DL. Секвенированные фрагменты соответствовали предполагаемым последовательностям из базы данных URGI. Отмечено, что два из них локализованы в хромосомах четвертой гомеологичной группы (B и D), а один ген локализован в пятой гомеологичной группе (A).

Для выявления особенностей активности гомеологичных генов TaSMT1 был проведен анализ экспрессии этих генов в корнях и листьях проростков пшеницы при действии низкой положительной температуры. Результаты показали, что ген TaSMT1-5A интенсивнее экспрессируется в листьях, а ген TaSMT1-4D проявляет большую активность в корнях, что может свидетельствовать об органоспецифичной экспрессии этих генов.

В целом была установлена дифференциальная экспрессия гомеологичных генов TaSMT1-5A и TaSMT1-4D пшеницы при действии холода, а также наличие выявленных стресс-чувствительных цис-элементов в структуре промоторов, что свидетельствует о сложности регуляции активности генов TaSMT1 при стрессе.

Завершают диссертационную работу заключение и выводы, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам и в достаточном объеме отражают результаты проведенных исследований.

Оценивая работу, следует подчеркнуть, что при обсуждении полученные результаты приводятся в сравнении с известными из литературных источников данными, что говорит об осведомленности и широком научном кругозоре автора работы в выбранной области исследования. Текст написан хорошим языком, структура диссертации логична, что позволяет воспринимать фактический материал. Иллюстративный материал убедительно подтверждает результаты проведенных исследований.

К замечаниям, приведенным выше, следует добавить некоторые **технические погрешности** в виде орфографических ошибок и опечаток (стр.44, 45, 49, 75, 78 и др.), неправильной нумерации глав (отсутствие главы 3.3) в тексте диссертации, повторов (стр. 87). Нумерация глав в автореферате также не соответствует тексту диссертации. Есть также небольшое количество неточностей при цитировании литературных источников. Например, ссылки на некоторые работы приведены как сольные работы одного автора без соавторов (Lindsey стр.7, 28; Wand – стр. 7,28; Piironen – стр.27) или неверно указаны соавторы (Olkkonen, Lehto – стр. 21 вместо Olkkonen, Levine – в списке). Однако эти погрешности малочисленны и не влияют на общее положительное впечатление от выполненной работы.

Заключение

Диссертационная работа А.Г. Сулкарнаевой представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на высоком методическом уровне. Получен ряд оригинальных данных в области физиологии растений, позволяющих существенно расширить представления о стресс-индуцированных изменениях растительной клетки. Довольно большое число работ, опубликованных по теме диссертации, в том числе статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, широкая апробация материалов исследования на конференциях разного уровня свидетельствуют о высокой теоретической и методической квалификации диссертанта. Все сделанные выводы обоснованы и подтверждены данными статистической обработки. Автореферат представляет собой краткое изложение диссертации, а его содержание в полной мере отражает содержание представленной работы.

