

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Минибаевой Ф.В.

на диссертационную работу **ЧЭНЬ ТИНЧЖО «Регуляция активности протонных насосов растительной клетки в ходе роста растяжением»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - физиология и биохимия растений

Диссертационная работа Чэнь Тинчжо посвящена расшифровке механизмов регуляции протонных помп растительной клетки, вовлеченных в ростовые процессы растительной клетки. Исследование активности и функциональной роли протон-транспортирующих систем растительных клеток – одно из традиционных направлений известной в мире научной школы физиологии и биохимии растений Санкт-Петербургского университета. Протонные АТФазы, локализованные на плазмалемме и тонопласте, а также вакуолярная протонная пирофосфатаза выполняют важнейшую функцию - поддержание рН цитоплазмы. Кроме того, все три насоса осуществляют первично-активный транспорт ионов водорода и, тем самым, генерируют мембранный потенциал, обеспечивающий движущую силу для транспорта ионов и ряда соединений через указанные мембраны. Эта тема, несмотря на длительную историю изучения, не утратила своей актуальности. В частности, накопленные к настоящему времени экспериментальные данные не позволяют однозначно ответить, каким образом происходит согласование работы протонных помп плазмалеммы и тонопласта – двух наиболее значимых мембранных компартментов клетки. Подобное согласование активности может иметь большое физиологическое значение, в частности, в ростовых процессах у растений. Так, широко известна роль  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы в реализации процесса роста клеток растяжением, однако значение протонных помп тонопласта для этого процесса до сих пор довольно дискуссионно. Пути регуляции активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы, особенно на пост-трансляционном уровне, достаточно хорошо изучены, в то время как представления о регуляции активности вакуолярных помп еще слишком фрагментарны. Еще менее информации доступно о способах модуляции активности протонных насосов на транскрипционном уровне. Хорошо известно, что  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы у большинства исследованных организмов кодируется мультигенным семейством. Показано, что у

растений арабидопсиса экспрессия различных генов характеризуется органоспецифичностью, изменяется в ходе развития растения и при действии различных биотических и абиотических факторов. Тем не менее, закономерности регуляции на транскрипционном уровне такого мультисубъединичного комплекса пока еще не ясны. Очень мало сведений накоплено и о возможности пост-трансляционного изменения активности  $H^+$ -АТФазы тонопласта. Кроме того, механизмы регуляции активности протонной пиррофосфатазы, фермента, генерирующего протонный градиент на тонопласте за счет энергии пиррофосфата, остаются недостаточно изученными, несмотря на наличие отдельных работ. Таким образом, актуальность диссертационной работы Чэнь Т. определяется не только тем, что автором и его научным руководителем поставлена задача выявить способы регуляции активности протонных насосов растительной клетки, но и тем, что впервые проведено сравнение активности всех трех транспортеров при реализации уникального для растительной клетки процесса роста растяжением.

Диссертационная работа Чэнь Т. изложена на 136 страницах, насчитывает 51 рисунок и 13 таблиц. Список литературы включает 180 источников, из которых 169 на иностранном языке. Работа состоит из нескольких разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение и Выводы. Во введении автор достаточно кратко формулирует основные предпосылки выполнения данного исследования. Следуя за логикой автора, становится понятным актуальность работы и теоретическая значимость результатов. В конце этого раздела четко сформулированы цель и задачи работы. Как правило, в данном разделе присутствует описание научной и практической новизны полученных автором данных, однако в данной диссертации этого не представлено.

Обзор литературы представляет собой целостный анализ современных представлений о структурных особенностях строения, кодирования, физиологической значимости трех основополагающих ферментов растительной клетки. Достаточно подробно изложена современная информация о  $H^+$ -АТФазе плазмалеммы. Автор описывает разнообразные механизмы регуляции этого фермента на транскрипционном, трансляционном и пост-трансляционном уровнях.

Большой интерес вызывает описание организации и функционирования  $H^+$ -АТФазы тонопласта. Автор демонстрирует свою эрудицию и подробно анализирует имеющиеся на настоящее время данные о возможной роли различных субъединиц фермента, а также механизмах пост-трансляционной модификации протон-транспортующего комплекса. Особый интерес вызывает рассмотрение физиологической функции и способов регуляции протонной пирофосфатазы. Завершается обзор литературы небольшим заключением, в котором автор критически оценивает недостаточность информации о согласовании функционирования и перераспределении активности протонных помп в реализации процессов жизнедеятельности растительной клетки. Это определило новизну и актуальность проведенного диссертационного исследования.

Следующий раздел посвящен краткому описанию объектов исследования, а также подробному рассмотрению использованных в работе методов. Кратко описаны два модельных растительных объекта, на которых проведено исследование, - проростки арабидопсиса и суспензионная культура клеток табака. Перечень методов заслуживает особого внимания. Чэнь Т. освоил и применил более 20 биохимических и молекулярно-биологических методов. Это позволило провести анализ экспрессии генов как на проростках арабидопсиса, геном которого секвенирован и аннотирован, так и подобрать праймеры к целевым генам табака, геном которого был секвенирован сравнительно недавно. Ознакомление с подробным описанием методов выделения, очистки плазмалеммы и тонопласта и проведения белкового и ферментативного анализа свидетельствует о несомненном трудолюбии и целеустремленности диссертанта. Чэнь Т. предложил оригинальный метод детектирования подкисляющей способности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы. Данный раздел диссертации снабжен рисунками, на которых приведены схемы получения очищенных субклеточных мембран. Автором проведена достаточная статистическая обработка полученных результатов.

В диссертационной работе Чэнь Т. получены оригинальные экспериментальные данные, которые подробно описаны в главе Результаты и обсуждение. Первый раздел посвящен описанию экспериментов с использованием проростков арабидопсиса. По результатам анализа интенсивности ростовых

процессов были найдены временные точки, которые позволили детектировать процессы при разной интенсивности роста растяжением. В этих точках была проанализирована интенсивность экспрессии генов, кодирующих  $H^+$ -АТФазу плазмалеммы, вакуолярную  $H^+$ -пирофосфатазу, а также субъединицы  $H^+$ -АТФазы тонопласта. Такой комплексный подход был использован впервые для анализа экспрессионной активности генов, кодирующих протонные насосы или их субъединицы. Автором были выявлены интересные различия в транскрипционной активности генов и содержании белка  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы в процессе роста гипокотыля и корня проростков арабидопсиса, что подтверждает органоспецифичность регуляции активности этого фермента. Особо хотелось бы отметить проведенный автором подробный филогенетический анализ различных субъединиц вакуолярной  $H^+$ -АТФазы, что позволило впервые выявить различия в эволюции этих субъединиц и предположить возможные механизмы появления вакуолярных  $H^+$ -АТФаз с новыми свойствами. Анализ уровня экспрессии генов, кодирующих различные субъединицы  $H^+$ -АТФазы тонопласта, позволили автору предположить, что динамика накопления продуктов транскрипции определяется характером ростовой реакции растений. Применение специфичных антител позволило подтвердить изменение в ходе роста содержания исследуемых белков и их субъединиц в составе тонопласта. Таким образом, автору впервые удалось показать различную динамику накопления продуктов транскрипции и представленность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы и вакуолярной  $H^+$ -пирофосфатазы, а также субъединиц  $H^+$ -АТФазы тонопласта в ходе роста растяжением.

Далее диссертант обосновывает использование второго модельного объекта, представленного суспензионной культурой клеток табака VBI-0. Клетки этой культуры сохраняют в своем жизненном цикле способность к росту растяжением. После синхронизации развития были отобраны временные точки, характеризующиеся различной интенсивностью роста растяжением. В данном разделе автор проанализировал изменения в ходе роста активности генов и содержания белка не только  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы, но и белков, участвующих в пост-трансляционной регуляции активности этого фермента, - 14-3-3 белков, протеинкиназы С1РК и протеинфосфатазы РР2С. Таким образом, проведение комплексного анализа ростовых процессов в сочетании с тестированием

гидролитической и транспортной функций протонных помп позволило автору доказать универсальность изменений, выявленных на нативных проростках и культуре растительных клеток.

В разделе Заключение Чэнь Т. суммирует полученные данные и предлагает схематическую модель изменения активности и перераспределения значимости протон-транспортирующих ферментов растительной клетки в процессе роста растяжением. Далее следуют обоснованные Выводы диссертационной работы.

В ходе ознакомления с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

1. В обзоре литературы из 180 источников, лишь 11 – русскоязычные. Свидетельствует ли это о том, что в России подобные исследования не проводятся? Хочется отметить как досадное недоразумение отсутствие цитирования некоторых работ российских коллег, в частности, посвященных пиррофосфатазе.
2. В экспериментах по анализу уровня экспрессии генов, как правило, используется несколько референсных генов, в то время как в настоящей диссертации – только один. Почему именно ген, кодирующий убиквитин, был выбран в качестве референсного гена для анализа интенсивности экспрессии?
3. Как автор объясняет разницу в изменении экспрессии генов, кодирующих субъединицы  $H^+$ -АТФазы тонопласта, на завершающем этапе роста растяжением у гипокотилей арабидопсиса и культуры клеток табака?
4. В работе имеются некоторые пунктуационные ошибки, опечатки, жаргонные словосочетания.

Однако эти недочеты и высказанные замечания не умаляют достоинств работы. Все возникшие вопросы носят дискуссионный характер и не вызывают сомнений в том, что представленная диссертационная работа является целостным завершённым исследованием. Диссертация написана хорошим литературным языком, последовательность изложения результатов и их обсуждения логически обоснованы. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы. Результаты исследования были доложены Чэнь Т. на нескольких международных и российских конференциях, опубликованы в трех публикациях изданий, рекомендованных ВАК.

Таким образом, диссертационная работа ЧЭНБ Тинчжо «Регуляция активности протонных насосов растительной клетки в ходе роста растяжением» соответствует требованиям п. 9 № «Положение о присуждении учёных степеней», утверждённому постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а ЧЭНБ Тинчжо заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - физиология и биохимия растений.



Минибаева Фарида Вилевна

Заведующий лабораторией окислительно-восстановительного метаболизма  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки (ФГБУН)  
«Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра  
Российской академии наук»

доктор биологических наук, специальность 03.01.05 - физиология и биохимия  
растений

420111 г.Казань ул. Лобачевского д. 2/31, а/я 30  
телефон: +7 843 2319045, e-mail: minibayeva@kibb.knc.ru

18.09.2017

