

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (СИФИБР
СО РАН)**

664033, г. Иркутск, а/я 317. Для телеграмм: Иркутск-33, Физиология.

Тел. 42-67-21, Факс: (3952) 51-07-54, ИНН 3812010449

E-mail: matmod@sifibr.irk.ru

От 21.07.2017 № 15335-22/5241.1/180

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Озолиной Н.В. на диссертационную ЧЭНБ Тинчжо «**Регуляция активности протонных насосов растительной клетки в ходе роста растяжением**», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Диссертационная работа посвящена изучению регуляции активности протонных насосов растительной клетки в ходе роста растяжением. Протонные помпы играют важную роль в жизнедеятельности клетки. Они контролируют рН и ионный гомеостаз цитозоля, что обеспечивает работу ферментов цитоплазмы, принимают активное участие в процессах транспорта метаболитов, в ответных защитных реакциях растения на стрессовое воздействие и т.д. О важной роли этих ферментов говорит тот факт, что из всех мембранных белков тонопласта H^+ -АТФаза составляет 15%, а H^+ -пирофосфатаза 10% (Maeshima, 2001). Одна из важных функций протонных помп пограничных мембран – участие в индукции роста растительной клетки растяжением. Это свойство растительных клеток является уникальным, и существенно отличает их от животных. Многообразны механизмы, которые могут регулировать активность этих ферментов. Достаточно хорошо они изучены на пост-трансляционном уровне. Однако о регуляции на транскрипционном уровне известно очень мало. До сих пор не ясно как меняется активность этих ферментов в ходе онтогенеза, в том числе в ходе роста растяжением. Исходя из вышеизложенного, актуальность диссертационной работы ЧЭНБ Тинчжо не вызывает сомнения.

Диссертация содержит все необходимые разделы, соответствующие общим требованиям к структуре диссертационной работы, и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы по изучаемой проблеме, описания объекта и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы.

Объём работы составляет 136 страниц, в том числе 51 рисунок и 13 таблиц. Список литературы включает 180 источников, в том числе 169 на иностранном языке.

Во введении автор обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи работы. Хотелось бы, чтобы во введении была также отражена новизна и практическая значимость проведённого исследования.

Обзор литературы хорошо структурирован. Подбор научной литературы, используемой для написания обзора и для обсуждения полученных результатов, соответствует теме диссертационной работы, и позволяет судить о современном состоянии изучаемого вопроса. В обзоре приведены известные на настоящий момент сведения о функциональной роли, структуре и регуляции изучаемых протонных помп. Представленные данные дают возможность в полной мере оценить место исследований, проведённых автором, в системе современных знаний. К сожалению из 180 приведённых источников только 11 являются русскоязычными. Литературный обзор заканчивается кратким анализом и обобщением имеющихся данных, выделены нерешённые вопросы, определившие актуальность, цель и задачи исследования.

В разделе «Материалы и методы», который занимает 29 стр. детально и достаточно подробно для воспроизведения описаны все применяемые методы исследования и методы статистической обработки полученных данных. Работу отличает широкое использование наиболее современных методов исследования (количественный анализ экспрессии генов с помощью ПЦР с детекцией в реальном времени, SDS электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блот анализ, транс-блот перенос, иммуноблот анализ, молекулярно-филогенетический анализ субъединиц H^+ -АТФазы тонопласта и др.), соответствующих поставленным задачам.

В разделе «Результаты и обсуждение» полученные материалы хорошо изложены и обсуждаются с привлечением современных литературных данных. К числу наиболее значимых можно отнести следующие:

1. Доказана регуляция работы изучаемых протонных помп на транскрипционном, трансляционном, и выявлена динамика ряда регуляторных механизмов на пост-трансляционном уровнях.

2. Впервые выявлена прямая корреляция динамики экспрессии с последующим изменением активности H^+ -АТФаз и H^+ -пирофосфатазы.

3. Впервые показана возможность перераспределения значимости протонных насосов плазмалеммы и тонопласта в процессе реализации основополагающего физиологического процесса – роста растяжением. На первичном этапе роста лидирующее положение занимает H^+ -пирофосфатаза, но в ходе развития гипокотыля с интенсификацией роста растяжением происходит снижение физиологической значимости этой протонной помпы. Происходит усиление роли H^+ -АТФазы тонопласта и H^+ -АТФазы плазматической мембраны, принимающих активное участие в реализации роста растяжением растительных клеток, что было показано через увеличение экспрессии генов, кодирующих их или их субъединицы, а также

накопление соответствующих белков в составе мембран, на этапе интенсивного роста растяжением гипокотилей этиолированных проростков

4. Впервые проведен молекулярно-филогенетический анализ аминокислотных последовательностей различных субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы. Показано, что различные субъединицы H^+ -АТФазы изменяются в ходе эволюции по-разному, хотя и являются структурными частями одного белка. На основе проведенного анализа можно охарактеризовать несколько основных особенностей эволюции, которые по-разному сочетаются у разных субъединиц этого фермента, такие как дубликации, различающиеся по времени возникновения, и консервативность.

Интерес представляет разработанный диссертантом новый метод экспресс определения закисляющей способности протонных помп с использованием 10% раствора бромкрезолового пурпурового, который без дорогого оборудования позволяет оценить транспортную активность этих ферментов в суспензионной культуре клеток растений. Метод может быть востребован для экспресс-тестирования протон-транспортирующей активности клеток различных суспензионных культур.

В главе «Заключение» представлен краткий итоговый анализ полученных в диссертации данных, и предложена модель изменения активности протон-транспортирующих ферментов растительной клетки в ходе роста растяжением.

Завершают работу 6 выводов, которые вытекают из результатов проведенных исследований, и соответствуют поставленной цели и задачам.

В целом, диссертация оставляет очень хорошее впечатление, хотя необходимо отметить некоторые вопросы, которые возникают после прочтения.

1. Почему не приведены критерии чистоты используемых в экспериментах мембранных фракций плазмалеммы и тонопласта?

2. Используемая в экспериментах концентрация бафиломицина для подавления гидролитической активности H^+ -АТФазы тонопласта должна полностью подавлять её активность, что не наблюдается в приведённых экспериментах

3. Был ли проведён ингибиторный анализ гидролитической активности H^+ -пирофосфатазы?

4. Хотя раздел «Материалы и методы» занимает 29 стр. в нём нет обоснования выбора объекта исследования. Это выясняется по ходу ознакомления с диссертацией на стр. 85 и 103.

Однако высказанные замечания не влияют на высокую оценку представленной диссертационной работы.

Всё вышеизложенное позволяет сделать заключение о том, что диссертация ЧЭНЬ Тинчжо представляет собой завершённую научную работу, результаты которой существенно дополняют наши знания о роли протонных помп в процессах роста растяжением и об изменении функциональной активности этих ферментов в онтогенезе.

Таким образом, диссертационная работа ЧЭНЬ 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 ЧЭНЬ Тинчжо заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Озолина Наталья Владимировна

Зав. лабораторией физиологии растительной клетки

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Института физиологии и биохимии

растений Сибирского отделения РАН (СИФИБР СО РАН)

доктор биологических наук 03.01.05 – физиология и биохимия растений

664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132

Тел. 98148824647, e-mail: ozol@sifibr.irk.ru



Подпись Н.В. Озолиной удостоверяю

Начальник отдела кадров СИФИБР СО РАН

М.Р. Дьяконова

21.07.2017₂