

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Акулинкиной Дарьи Валерьевны «Ассоциация светоиндуцируемых стрессовых HliA/HliB белков с фотосистемами клеток цианобактерии *Synechocystis* РСС 6803», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Жизнь на планете Земля в большой степени поддерживается оксигенным фотосинтезом, так как это основной источник полезной химической энергии в биосфере и кислорода в атмосфере. Тилакоидные мембранные кислород-выделяющих организмов (цианобактерии, водоросли, высшие растения) являются местом локализации двух фотокаталитических пигмент-белковых комплексов (фотосистема 2 (ФС2) и фотосистема 1 (ФС1)). Каждый мономер фермента с мол. массой 330-350 кДа содержит по одной копии 20 (в случае ФС2) и 12 (в случае ФС1) белковых субъединиц и содержат ~100 и ~130 небелковых кофакторов, соответственно. Следует отметить, что в состав комплекса ФС1 помимо продуктов генов, обозначаемых как *psaA-psaF*, *psaI-psaM*, и *psaX*, также входят дополнительные белки, такие как *IsiA* и *Hli*. Известно, что эти низкомолекулярные (6-10 кДа) односпиральные белки необходимы для выживания организмов в условиях высокой интенсивности света.

Актуальность данной диссертационной работы прежде всего обусловлена тем, что в ней впервые детально описана ассоциация стресс-индуцируемых белков HliA/HliB с цианобактериальными комплексами ФС2 и ФС1 в нормальных и стрессовых условиях.

Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, иллюстрирована 15 рисунками и 3 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 177 наименований. Основные положения диссертации опубликованы в 11 печатных работах, в том числе 3 статьях, 2 статьях в сборниках и 6 тезисах докладов конференций.

Обзор литературы изложен на 50 страницах машинописного текста и включает 3 рисунка. В нем крайне лаконично описаны современные представления о фоторецепторах, световом сигналинге, фотоингибиции, эволюции и классификации белков светособирающего антенного комплекса. Особый интерес представляет описание Hli белков цианобактерий, генов Hli и регуляции их экспрессии, ассоциации Hli белков с ФС2 и ФС1, фотопротекторной

роли этих белков при биогенезе ФС2, а также в метаболизме хлорофилла. В целом, Д.В. Акулинкина демонстрирует хорошее знание научной литературы в своей области.

В Главе “**Объекты и методы исследования**” представлено описание препаративно-биохимических и биофизических подходов, используемых автором для выполнения поставленных задач и достижения основной цели работы. В качестве основного методического достижения следует выделить возможность идентификации белков с помощью Вестерн-блот анализа, идентификацию белков HliA/HliB с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии MALDI-TOF, а также использование конфокальной лазерной микроскопии для выявления субклеточной локализации HliA/HliB белков. Представляет интерес также использование трех мутантов, а именно мутанта без ФС2, мутанта без тримеров ФС1 и мутанта, не содержащего ФС1 и ФС2.

Глава «**Результаты исследования**» изложена на 28 страницах. Поскольку целью представленной работы являлось определение локализации светоиндуцированных белков HliA/HliB с фотосистемами цианобактерий *Synechocystis* PCC 6803, а также изучение возможных функций этих белков, в начальном этапе представлены данные касающиеся выделения хлорофилл-белковых комплексов. Автору удалось подобрать оптимальное соотношение хлорофилл:детергент (1:15) для достижения максимального выхода этих комплексов с наименьшим образованием свободных пигментов. Использование анионообменной хроматографии позволяет автору получить тримеры ФС1 и фракцию, содержащую мономеры ФС1 вместе с комплексом ФС2.

Наибольший научный интерес представляет использование автором вестерн-блот анализа для изучения ассоциации белков HliA/HliB с тримерами ФС1 из клеток дикого типа. С использованием данного подхода было показано, что белки HliA/HliB ассоциированы как с фракцией тримеров ФС1, так и с фракцией, содержащей мономеры ФС1 и комплекс ФС2. К важным результатам также можно отнести данные о том, что содержание HliA/HliB в тримерах ФС1 после светового стресса увеличивается в 1,7 раза по сравнению с неосвещенными клетками.

По моему мнению, результаты, касающиеся ассоциации HliA/HliB белков с мономерами ФС1 у мутанта, дефицитного по ФС2, представляют собой одно из наиболее детальных исследований по данному вопросу. В ходе экспериментов с этим мутантом было продемонстрировано, что при фракционировании на колонке

пигмент-белковых комплексов мутанта выявляются только тримеры и мономеры ФС1. При этом содержание тримеров ФС1 понижалось относительно содержания мономеров ФС1 у мутанта по сравнению с клетками дикого типа. Показано, что во фракции, содержащей тримеры комплексов ФС1, не удалось обнаружить белки HliA/HliB. Автор предполагает, что это может быть связано с тем, что при делеции ФС2 могут происходить изменения в структуре тилакоидной мембранны, и вероятно, также в структуре тримера.

Не могу не отметить также важность результатов по изучению препаратов, лишенных тримеров ФС1. Показано, что белки HliA/HliB способны ассоциироваться с мономерами ФС1 и комплексом ФС2.

Научная новизна исследования и полученных автором диссертации результатов заключаются также в следующем:

- обнаружено присутствие HliA/HliB белков в тилакоидных мембранах мутанта дефицитного по обеим фотосистемам;
- выявлена субклеточная локализация HliA/HliB белков в клетках дикого типа и трех мутантов (см. ранее) с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии;
- определена локализация этих белков с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии MALDI-TOF;
- сопоставление активностей ФС1 у клеток, содержащих и не содержащих HliA/HliB белки.

В главе «**Обсуждение результатов**» детально описана локализация белков HliA/HliB и их роль, проведено сопоставление полученных результатов с мировым уровнем. Основной вывод автора заключается в том, что эти низкомолекулярные стрессовые белки могут связываться как с мономерами, так и тримерами ФС1, а также с комплексом ФС2. Эти данные указывают на универсальную функцию в защите фотосистем цианобактерий.

Работа также имеет практическое значение, которое состоит в следующем: Полученные автором результаты, несомненно, могут быть использованы для исследования регуляции процессов фотосинтеза, определяющего продуктивность сельскохозяйственных растений.

В то же время диссертационная работа Д.В. Акулинкиной **содержит ряд недостатков**.

1. Было бы целесообразно добавить в раздел 1.7.1 “Обзора литературы” схему тилакоидной мембранны, содержащей пигмент-белковые комплексы ФС1 и

ФС2, так как исследуются ассоциация стрессовых белков именно с этими комплексами;

2. Не совсем корректно говорить о невозможности отделения мономеров ФС1 от мономерной формы ФС2 (см. работу: G. Shen et al. Assembly of Photosystem I (2002) J. Biol. Chem. 277, No. 23, pp. 20343–20354)). С другой стороны, в случае, когда есть возможность использовать мутанты, лишенные комплексов ФС2 (как в настоящей работе), в такой процедуре просто нет необходимости;
3. Об отсутствии комплексов ФС2 в тилакоидных мембранах соответствующих мутантов свидетельствуют не только структурные, но и функциональные данные. Однако, в работе не было описано каким образом определялась функциональная активность комплексов ФС2;
4. Предположение о том, что Hli белки являются переносчиками хлорофилла и участвуют в запасании и сохранении хлорофилла при биогенезе и фотодеструкции хлорофилл-связывающих белков ФС1 и ФС2, представляется мне крайне сомнительным, так как не подтверждается экспериментальными данными;
5. В тексте всюду используется словосочетание «хлорофилл-белковые комплексы», тогда как правильнее говорить о «пигмент-белковых комплексах», так как даже мономер ФС1 содержит по меньшей мере 22 β-каротинов;

Также хотел бы отметить несколько мелких недочетов.

1. Для получения препаратов ФС используются модифицированная процедура. Поэтому целесообразно дать ссылку на оригинальную работу;
2. При упоминании соотношения хлорофилл:детергент необходимо указать, какое именно соотношение имеется в виду;
3. В тексте часто встречается фраза «цитохромный комплекс». Цианобактериальная тилакоидная мембрана является местом локализации не только ФЭТЦ, но и дыхательной цепи. Поэтому правильно «цитохромный комплекс b_6f ».

Однако, хочу отметить, что сделанные замечания не снижают общей положительной оценки диссертации и являются лишь пожеланиями относительно дальнейшего изучения темы.

Большинство результатов диссертации являются оригинальными и научно обоснованными. Они были опубликованы в рецензируемых научных журналах и апробированы на отечественных и международных конференциях. Достоверность

полученных результатов подтверждается тщательностью постановки исследований, количественным анализом экспериментальных данных, а также их соответствием результатам, известным из литературы. Выводы диссертации представляются обоснованными и адекватными полученным в работе экспериментальным данным. Автореферат правильно и полно отражает содержание диссертации.

Считаю, что диссертационная работа «Ассоциация светоиндуцируемых стрессовых HliA/HliB белков с фотосистемами клеток цианобактерии *Synechocystis* РСС 6803», соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 03.01.04 «Биохимия», а её автор Д.В. Акулинкина заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук.

Официальный оппонент:

Мамедов Махир Джадар оглы

Адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40.

Телефон: 8(495) 939-31-81, факс: +7 (095) 939-0338,

e-mail: mamedov@genebee.msu.ru

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского

Ведущий научный сотрудник отдела биоэнергетики,
доктор биологических наук (код специальности 03.00.04 – Биохимия)

25.01.2016

Подпись д.б.н. М.Д. Мамедова заверяю

Ученый секретарь

НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ

д.ф.-м.н.

Телефон: 8 (495) 939-53-63,

e-mail: fetisova@genebee.msu.ru

25.01.2016

