

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Акулинкиной Дарьи Валерьевны на тему «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

Цианобактерии – древние организмы, сохранившиеся до наших дней благодаря чрезвычайно высокой пластичности метаболизма, которая достигается, в том числе, наличием широкого арсенала адаптивных реакций клетки к неблагоприятным факторам среды. Диссертация Д.В. Акулинкиной посвящена одному из них – изучению способов защиты фотосинтетического аппарата от избыточного света. В процессе эволюции фотосинтезирующие организмы выработали различные механизмы защиты от избыточного света. Одним из таких механизмов является индукция синтеза белков Hlip (high-light induced proteins), которые обнаруживают сходство со светособирающими хлорофилл a/b связывающими белками растений и, по-видимому, являются их эволюционными предшественниками. Известно, что эти хлорофилл-связанные белки не участвуют в светосборе и сформировались как «мусорщики», удаляющие отслуживший клетке хлорофилл для предотвращения образования активных форм кислорода. С другой стороны, предполагается, что Hlip могут служить белками-переносчиками хлорофилла при синтезе новообразованных комплексов фотосистемы 2 (ФС). Они локализованы в тилакоидной мембране и необходимы для выживания организмов при экстремально ярком освещении. Однако детально механизмы функционирования, взаимодействие с фотосинтезирующим аппаратом и локализация этих белков слабо изучены. В этой связи диссертационная работа Д.В. Акулинкиной, посвященная изучению ассоциации светоиндуцируемых стрессовых HliA/HliB белков с фотосистемами клеток цианобактерии *Synechocystis* РСС 6803, является актуальной, соответствует современному мировому уровню и обладает высокой теоретической и практической значимостью.

Диссертационная работа Д.В. Акулинкиной имеет традиционную структуру: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение и выводы. Диссертационная работа изложена на 134 страницах, содержит богатый иллюстративный материал, представленный 15 рисунками, и включает 3 таблицы. Список использованных источников литературы содержит 177 наименований, большинство из которых опубликовано в ведущих международных журналах.

Во введении к диссертации обоснован выбор темы работы и раскрыта ее актуальность. Кроме того, в данном разделе поставлена цель работы и сформулированы ключевые задачи исследования, положения работы, выносимые на защиту, а также научное и практическое значение диссертационное работы.

Обзор литературы охватывает широкий круг научных исследований по проблемам светового стресса, описывает характеристики исследуемых белков, раскрывает источники, послужившие отправной точкой научных изысканий соискателя. В этом разделе представлены общие сведения по фотоингибиции, мультигенному семейству белков светособирающих комплексов, их роли в защите фотосинтетического аппарата от

избыточного света. Приведена известная на данный момент информация об изучаемых белках HliA/HliB, генах Hli белков и их экспрессии, ассоциации Hli белков с ФС2 и их роли при её биогенезе. Для анализа современного состояния проблемы светового стресса автор привлекла литературу по высшим растениям и микроводорослям, не ограничиваясь цианобактериями.

Раздел «Материалы и методы» содержит описание и развёрнутую характеристику использованных автором лабораторных методов исследований. В диссертационной работе были применены как традиционные, так и современные методы. С помощью вестерн-блоттинга докторант определяла локализацию и содержание стрессовых белков HliA/HliB в составе хлорофилл-белковых комплексов цианобактерии *Synechocystis* РСС 6803. Иммуноокрашенные препараты клеток дикого типа и мутантов цианобактерий исследованы с помощью лазерной конфокальной сканирующей микроскопии. Для фракционирования белковых комплексов солюбилизованных тилакоидных мембран была использована анионообменная хроматография с последующим анализом фракций с помощью электрофореза и вестерн-блоттинга. Для идентификации белков использована масс-спектрометрия MALDI-TOF. Кроме того в работе использованы физиологические подходы при культивировании цианобактерий при разных интенсивностях света и методы исследования функционального состояния фотосинтетического аппарата.

В третьем разделе диссертации «Результаты исследования» приводится подробное описание проведённых исследований и изложены полученные результаты. На первом этапе докторант исследовала ассоциацию HliA/HliB белков с фотосистемами цианобактерии в клетках дикого типа цианобактерии *Synechocystis*. Было показано, что они обнаруживаются во фракции тримеров ФС1, а также среди полипептидов, содержащих ФС2 и мономеры ФС1. В дальнейшем очень интересный подход был использован для уточнения локализации HliA/HliB белков. Автор диссертации использовала широкий спектр мутантов *Synechocystis*, не содержащих тримеров ФС1, лишенных ФС2 или обеих фотосистем. Для получения интактных препаратов комплексов был модифицирован метод фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран. Акулининой Д.В. впервые удалось показать, что HliA/HliB белки ассоциированы не только с тримерами, но и с мономерами фотосистемы 1. В этой главе приводятся результаты исследований фотохимической активности фотосистемы 1 в присутствии и в отсутствии HliA/HliB белков. Сравнение активности ФС1 у клеток, содержащих и не содержащих HliA/HliB белки, по мнению автора, указывает на их важную роль в оптимальной активности фотосистемы.

В четвертом разделе «Обсуждение результатов» полученные результаты рассмотрены в сравнении с данными литературы, опубликованными ранее. Докторант приходит к важному выводу о том, что HliA/HliB белки могут связываться с основными хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран цианобактерий: с мономерами ФС1, с комплексом ФС2 и с тримерами ФС1. Автор высказывает 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.

Заключение содержит чётко и кратко сформулированные выводы проведённого анализа полученных результатов.

Работа выполнена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к кандидатским диссертациям. Она имеет чёткую структуру, содержит правильно выполненный и качественно оформленный иллюстративный материал. Список использованной литературы содержит большое количество источников и охватывает широкий спектр публикаций по исследуемой проблематике.

В целом, Дарьей Валерьевной Акулининой проделана большая и интересная работа, в которой удалось показать, что HliA/HliB белки ассоциированы не только с ФС 2, как считалось ранее, но и с ФС1. Это свидетельствует об универсальной роли этих белков в защите хлорофилл-белковых комплексов от светового стресса. Степень достоверности полученных результатов обеспечена достаточно высокой точностью используемых методов исследования и хорошей воспроизводимостью полученных данных. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационной работы.

Научная новизна и положительные стороны работы определяются тем, что:

1. Впервые показана ассоциация HliA/HliB белков с ФС 1, что ранее неоднократно опровергалось другими исследователями.

2. Обнаружено, что HliA/HliB белки синтезируются в клетке в отсутствие ФС1 и ФС2. Это позволяет предположить, что данные белки важны не только для защиты фотосинтетического аппарата от избыточного света, но и участвуют в других клеточных процессах.

3. Показано, что частичный переход цианобактерий на гетеротрофное питание не влияет на световую индукцию HliA/HliB белков.

4. Выявлено, что отсутствие тримеров ФС1 не влияет на ассоциацию HliA/HliB белков с мономерами ФС1 и комплексом ФС2.

Существенных недостатков данная диссертация не содержит. Однако можно отметить некоторые недочеты:

1. В разделе обзора литературы излишне много внимания уделено фоторецепторам и световому сигналингу.
2. Очень подробно описаны некоторые методики, например, электрофорез.
3. Отсутствие кривых роста культур.
4. Анализ белков с помощью вестерн-блотинга показан при действии света разной интенсивности, тогда как электрофореграммы во многих случаях представлены на рисунках только в контрольном варианте.
5. Использованный автором метод выделения ХБК не позволил разделить комплексы ФС2 и мономеры ФС1. Однако поделенная на две части эта «широкая» суммарная фракция показала различие по составу полипептидов, а также по наличию Hli белков. На мой взгляд, следовало бы описать эти фракции, хотя бы по степени обогащения отдельными комплексами.
6. Есть и опечатки, иногда приводящие к путанице. Так, на стр. 11 автореферата написано, что белки Hli идентифицированы в составе фракций, указанных на рис. 4в, где их нет. По-видимому, надо смотреть на рис. 4а.

Следует заметить, что выявленные небольшие недостатки не влияют на общую научную и практическую значимость работы, хотя и требуют устранения.

Значимость данной диссертационной работы определяется тем, что позволяет расширить представления о светоиндуцируемых белках Hli. Эти данные могут быть использованы для изучения регуляции процессов фотосинтеза, что остается очень актуальным в настоящее время. Разработанная в ходе выполнения работы модификация метода выделения позволяет получать нативные хлорофилл-белковые комплексы с наименьшими потерями. Все это обуславливает практическую значимость работы и показывает широкий спектр возможностей применения полученных данных.

Полученные автором данные вносят существенный вклад в разделы биохимии фотосинтеза и дают возможность дальнейшей разработки темы в следующих аспектах:

- 1) изучение функциональной роли HliA/HliB белков в синтезе хлорофилла,
- 2) исследование ассоциации HliA/HliB белков с субъединицами фотосистемы 1.

Работа была доложена на международных и всероссийских конференциях. Научные публикации достаточно и в полной мере отражают содержание диссертации.

В целом, диссертационная работа Акулинкиной Дарьи Валерьевны полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней» утверждённого Правительством РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 пункт 9, а её автор, Акулинкина Дарья Валерьевна, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04-Биохимия.

Официальный оппонент

Пронина Наталья Александровна

Адрес: 127276 Российская Федерация, г. Москва, ул. Ботаническая, д.35

Тел.: 8(499) 977-80-22, факс: 8(499) 977-80-18;

e-mail: na.pronina@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Ведущий научный сотрудник Лаборатории управляемого фотобиосинтеза

доктор биологических наук, профессор

код специальности: 03.01.05-физиология и биохимия растений

Дата: 20 января 2016 г.

Подпись д.б.н. Н.А. Прониной заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ науки «Институт физиологии растений им. А.Н. Тимирязева» РАН

к.б.н.

Тел.: 8(499) 977-80-22, e-mail: ifr@ippras.ru

Дата: 20 января 2016 г.

ПОДПИСЬ

ГРОЗЯЕВА Н.А.

ЗАВЕРЕНЬ

ЗАВ. ОТД. КАДРОВ



Багашова Е.Г.

