

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО  
ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ  
ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА  
НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА  
СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 25 февраля 2016 г. №3 о присуждении  
Акулинкиной Дарье Валерьевне, гражданство Российская Федерация, учёной  
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Ассоциация светоиндуцируемых стрессовых HliA/HliB белков с фотосистемами клеток цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 22 декабря 2015 года (протокол № 4) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утверждён Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007г. с учётом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013г. №74/нк и от 10.02.2014г. №55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015г. № 1166/нк.

Соискатель Акулинкина Дарья Валерьевна, 1988 года рождения, в июле 2011 г. окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский государственный университет –

Московскую сельскохозяйственную академию имени К.А. Тимирязева по специальности «Агроном». В декабре 2011 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, где проходила обучение по июль 2015 г. С июля по декабрь 2015 г. продолжила обучение в очной аспирантуре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Диссертационную работу Акулинкина Д.В. выполняла в лаборатории биоэнергетики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель – Юрина Надежда Петровна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», заведующая лабораторией биоэнергетики.

Официальные оппоненты:

Пронина Наталья Александровна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория управляемого фотобиосинтеза, ведущий научный сотрудник;

Мамедов Махир Джафар Оглы, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, отдел биоэнергетики, лаборатория электрогенных фотопроцессов, ведущий научный сотрудник

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук в своём положительном заключении, подписанном заместителем директора, заведующим лабораторией фотосинтетического окисления воды Климовым Вячеславом Васильевичем, указала, что диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой и отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013г., а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, профессор Пронина Наталья Александровна является специалистом в области изучения биохимии и физиологии фотосинтеза у цианобактерий и имеет работы, в которых описывается фотосинтетическая ассимиляция углерода у фототрофов; доктор биологических наук Мамедов Махир Джафар Оглы является специалистом в области изучения функциональной активности фотосинтетического аппарата цианобактерий и имеет работы по данному направлению. Выбор ведущей организации обоснован активно ведущимися исследованиями в области изучения процессов фотосинтеза и молекулярных механизмов регуляции фотосинтеза, а также наличием высококвалифицированных специалистов, проводящих исследования в данной области.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 11 публикациях, в том числе:

в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, публикации в которых удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842.

1. Юрина Н.П., **Мокерова Д.В.**, Одинцова М.С. Светоиндуцируемые стрессовые белки пластид фототрофов // Физиология растений. 2013. Т.60. №5. стр. 611–624.
2. Chankova S.G., Dimova E.G., Mitrovska Z., Miteva D., **Mokerova D.V.**, Yonova P.A., Yurina N.P. Antioxidant and HSP70B responses in *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes with different resistance to oxidative stress // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2014. V.101. P.131–137.
3. **Акулинкина Д.В.**, Болычевцева Ю.В., Еланская И.В., Карапетян Н.В., Юрина Н.П. Ассоциация светоиндуцируемых стрессовых белков HliA/HliB с тримерами и мономерами фотосистемы 1 в клетках цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 // Биохимия. 2015. Т.80. №10. стр. 1523-1532.

в 2 статьях в сборниках:

1. **Мокерова Д.В.**, Болычевцева Ю.В., Еланская И.В., Юрина Н.П., Карапетян Н.В. Стрессовые белки HliA/B *Synechocystis* PCC 6803: локализация в фотосистемах // Сборник статей. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», 2014, Минск, Беларусь, стр. 37-40.
2. **Akulinkina D.**, Yurina N. High-light inducible proteins HliA/HliB are essential for light stress-adaptation in cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 // Seminar of ecology – 2015 with international participation. Proceedings, 23-24 April 2015. Sofia, Bulgaria.

и 6 тезисах в материалах российских и международных конференций.

В публикациях отражены экспериментальные работы, проведённые в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора Прониной Н.А.** положительный.

Отзыв содержит следующие замечания: «В разделе обзора литературы излишне много внимания уделено фоторецепторам и световому сигналингу. Очень подробно описаны некоторые методики, например, электрофорез.

Отсутствие кривых роста культур. 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. Используемый автором метод выделения ХБК не позволили 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. Есть и опечатки, иногда приводящие к путанице. Так, на стр.11 автореферата написало, что белки Hli идентифицированы в составе фракций, указанных на рис. 4в, где их нет. По-видимому, надо смотреть на рис. 4а».

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Мамедова М.Д. положительный.**

Отзыв содержит следующие замечания: «Было бы целесообразно добавить в раздел 1.7.1 “Обзора литературы” схему тилакоидной мембраны, содержащей пигмент-белковые комплексы ФС1 и ФС2, так как исследуются ассоциация стрессовых белков именно с этими комплексами. 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, лишённые комплексов ФС2 (как в настоящей работе), в такой процедуре просто нет необходимости. 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. 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. 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 отмечено несколько недочетов: «Для получения препаратов ФС используется модифицированная процедура. Поэтому целесообразно дать ссылку на оригинальную работу. При упоминании соотношения хлорофилл:детергент необходимо указать, какое именно соотношение имеется в виду. В тексте часто встречается фраза «цитохромный комплекс». Цианобактериальная тилакоидная мембрана является местом локализации не только ФЭТЦ, но и дыхательной цепи. Поэтому правильно «цитохромный комплекс  $b_6f$ ».

**Отзыв Ведущей организации Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук** положительный. Отзыв содержит следующие замечания: «В лабораторных исследованиях не использовались мутанты, дефицитные по белкам HliA/HliB. Не приведена динамика накопления HliA/HliB белков при изменении продолжительности воздействия светового стресса». Также имеется ряд замечаний технического характера, стилистические и грамматические ошибки: «Номера фракций в подписи к рисунку 3.1 и в тексте на стр.80, описывающем эксперимент, не совпадают (в подписи к рисунку «24-27» и «38-43», а в тексте – «23-26» и «40-43»). На той же (80) странице в тексте, комментируя содержание белков HliA и HliB в клетках, растущих при высокой интенсивности света, автор пишет о том, что содержание увеличивается «по сравнению с неосвещенными клетками», хотя речь идет о сравнении с клетками, растущими при нормальном освещении. На странице 86 – описка, которая меняет смысл предложения. Написано: «Показано, что выращивание в среде с глюкозой при низкой освещенности не приводит к отсутствию HliA и HliB в тримерах ФС1 дикого типа», хотя из рисунка 3.4 и из текста понятно, что фракции, полученные из клеток, выращенных в условиях низкой

освещенности, не содержат этих белков. На стр. 69 написано: «наносили 50 мкг хлорофилла», хотя имеются ввиду белковые фракции, содержащие 50 мкг хлорофилла. На стр.102 написано – «...не приводит к делеции белков». Термин делеция в данном контексте не уместен».

**На автореферат поступили отзывы от:**

профессора кафедры ботаники Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, доктора сельскохозяйственных наук Маланкиной Елены Львовны. В отзыве приведено следующее замечание: «электрофореграммы представлены в виде черно-белых рисунков, тогда как в цветном виде они были бы нагляднее»;

заведующего кафедрой селекции и семеноводства садовых культур Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, кандидата сельскохозяйственных наук Монахоса Сократа Григорьевича;

научного сотрудника лаборатории молекулярно-генетических основ иммунитета растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук кандидата биологических наук Коростылевой Татьяны Викторовны;

заведующего Отделом эволюционной биохимии Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, доктор биологических наук, профессор Троицкого Алексея Викторовича;

ведущего научного сотрудника лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные

основы биотехнологии» Российской академии наук», доктора биологических наук Чеботаревой Натальи Александровны.

**В дискуссии приняли участие:**

доктор биологических наук, профессор Крицкий Михаил Сергеевич, главный научный сотрудник лаборатории экологической и эволюционной биохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

доктор биологических наук, профессор Валуева Татьяна Александровна.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие основные результаты:

1. При оптимальных условиях освещения светоиндуцируемые HliA/HliB белки обнаружены в тилакоидных мембранах клеток дикого типа, а также мутантов *Synechocystis* без фотосистемы 2 (ФС2), без обеих фотосистем и не содержащих тримеры фотосистемы 1 (ФС1).
  2. Впервые показано, что HliA/HliB белки ассоциированы не только с тримерами, но и с мономерами ФС1.
  3. Показано, что отсутствие тримеров ФС1 у мутанта  $\Delta psal$  не влияет на ассоциацию HliA/HliB белков с мономерами ФС1 и комплексом ФС2.
- Частичный переход цианобактерий на гетеротрофное питание не влияет на световую индукцию HliA/HliB белков.
4. Обнаружено, что в тилакоидных мембранах мутантов *Synechocystis*, не содержащих ФС1 и комплекс ФС2, HliA/HliB белки присутствуют. Это позволяет предположить, что HliA/HliB белки выполняют разнообразные клеточные функции.
  5. На основании полученных данных о том, что HliA/HliB белки находятся в ассоциированном состоянии как с тримерами и мономерами фотосистемы 1,

так и с комплексом фотосистемы 2, выдвинуто предположение об универсальной роли этих белков в защите фотосинтетического аппарата от избыточного света.

#### Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что

Впервые показана ассоциация HliA/HliB белков с мономерами фотосистемы 1.

Показано присутствие белков HliA/HliB в тилакоидных мембранах цианобактерий, не содержащих комплексы фотосистемы 1 и фотосистемы 2.

#### Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- полученные в работе данные об ассоциации стрессовых свето-индуцируемых белков с мономерами и тримерами фотосистемы 1 и комплексом фотосистемы 2 предполагают универсальную роль этих белков в защите фотосинтетического аппарата от избыточного света;
- исследование локализации стрессовых свето-индуцируемых белков имеет самостоятельный научный интерес и позволяет расширить представления о защитных функциях свето-индуцируемых Hli белков;
- эти данные могут быть использованы для изучения регуляции процессов фотосинтеза, определяющего продуктивность сельскохозяйственных растений.

#### Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- используемые методики исследования и проведённые расчёты корректны;
- полученные соискателем результаты соответствуют современным представлениям о защитных функциях светоиндуцируемых стрессовых белков;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;

- полученные экспериментальные закономерности являются статистически достоверными;
- выводы, представленные в работе, логичны и полностью соответствуют результатам проведённого исследования.

Личный вклад соискателя состоит в:

- разработке модифицированной методики выделения и фракционирования пигмент-белковых комплексов тилакоидных мембран цианобактерий;
- получении экспериментальных данных об ассоциации HliA/HliB белков с фотосистемами 1 и 2;
- участие в апробации результатов исследования;
- обработке и интерпретации экспериментальных данных;
- подготовке публикаций по выполненной работе.

Диссертация Акулинкиной Д.В. является законченной научно-квалификационной работой, охватывающей основные вопросы поставленной научной задачи, что подтверждается наличием логичного плана исследования, сильной методологической платформой, концептуальностью и взаимосвязанностью выводов с результатами.

На заседании 25 февраля 2016 года диссертационный совет принял решение присудить Акулинкиной Дарье Валерьевне учёную степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 18 докторов наук, 12 докторов биологических наук, 6 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав

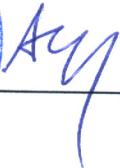
совета, проголосовали: «за» 19, «против» нет, «недействительных бюллетеней» нет.

Заместитель председателя  
диссертационного совета  
ФИЦ Биотехнологии РАН  
доктор химических наук, профессор

  
Б.Б. Дзантиев

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
ФИЦ Биотехнологии РАН  
кандидат биологических наук



  
А.Ф. Орловский

«25» февраля 2016 г.