

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Балакиревой Анастасии Васильевны на тему: «Протеиназы пшеницы и их активация в норме и при биотическом стрессе» по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

В последние годы заметно растет интерес к исследованиям протеолитических ферментов растений. Это объясняется той важной ролью, которую пептидазы играют в метаболизме растений и, в первую очередь, в таких ключевых процессах как созревание, прорастание семян, системная приобретенная устойчивость, программируемая клеточная смерть. Однако при этом уровень и интенсивность исследований растительных пептидаз продолжают значительно отставать от аналогичных исследований, проводимых на животных и микроорганизмах. Пока недостаточно изученными остаются структурно-функциональные характеристики большинства растительных ферментов, очень мало данных о механизмах активации и регуляции их активности. Все это дает основание считать тему диссертационной работы А.В. Балакиревой интересной и актуальной.

Диссертация А.В. Балакиревой, направленная на изучение пептидаз пшеницы и, в частности, их активации в норме и при биотическом стрессе, построена по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы и экспериментальной части, включающей в себя разделы «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов» и списка цитированной литературы.

Обзор литературы обобщает большое количество информации, имеющейся по теме диссертационной работы, и дает полную картину современного состояния проблемы. Обзор можно разделить на две части - научную и практическую. В первой подробно рассмотрены современные

представления о растительном иммунитете, из каких типов ответов состоит иммунитет растений и каково участие растительных пептидаз в этих ответах. Подробно проанализированы структура, специфичность, свойства, синтез и активация папаин-подобных цистеиновых протеиназ, а также их участие в протеолитических каскадах во время программируемой клеточной смерти. Вторая часть литературного обзора посвящена применению или потенциальной возможности применения пептидаз растений в биомедицине, в частности, при лечении ожогов, болезней ЖКТ, онкологии, заживлении ран, коагуляции и тромбозе, поддержании гигиены полости рта. Литературный материал изложен ясно и доступно, с большим количеством необходимых деталей и демонстрирует компетентность и эрудированность автора в данной области. Очень удобны и показательны приводимые автором схемы, где демонстрируется участие эндогенных пептидаз в различных путях иммунитета растений, а также сравнительный анализ участия пептидаз растений и животных в программируемой клеточной смерти.

К некоторым недостаткам обзора я бы отнес чрезмерную страсть к использованию сокращений (не только авторских, но и взятых без расшифровки из статей), что делает некоторые предложения похожими на зашифрованное послание. При этом часть сокращений отсутствует в приведенном списке сокращений, часть расшифровывается в тексте, но только спустя несколько абзацев или страниц после первого появления. Исходя из контекста, создается впечатление, что три разных сокращения (MAMP, PAMP, DAMP), используемых в тексте обзора, выражают одно и то же и для простоты восприятия их можно было бы заменить каким-то одним. Кроме того, хотелось бы понять, в чем их отличие от ранее используемого термина элиситоры?

В разделе «Материалы и методы» представлен спектр молекулярно-генетических и биохимических современных методов, использование которых полностью соответствовало поставленным автором

экспериментальным задачам. Раздел написан основательно и подробно. Несомненно высокий методический уровень и умелое владение автором описанными методами явилось залогом успешного выполнения работы.

К наиболее существенным результатам диссертационной работы можно отнести следующие. Были идентифицированы с помощью биоинформатических методов пептидазы, кодируемые в геноме пшеницы, и определена их принадлежность к семействам пептидаз различных каталитических типов: цистеиновым, сериновым, аспартатным, треониновым и металлопротеиназам. Автору удалось обнаружить 1544 протеиназы, среди них: 459 цистеиновых протеиназ из 12 семейств, 275 металлопротеиназ из 17 семейств, 336 аспартатных протеиназ из двух семейств, 446 сериновых протеиназ из пяти семейств и 28 треониновых протеиназ. Для всех протеиназ были идентифицированы доменные структуры. Были сконструированы филогенетические деревья на основе выравниваний соответствующих доменов для семейств, членов которых связывали с иммунитетом растений, таких как C1, C13, C14 и S8. Было выяснено, что деградом пшеницы варьирует на уровне сортов. Так, деградомы Хакасской (более чувствительный сорт пшеницы к атакам патогенов) и Дарьи (более устойчивый сорт) различаются примерно на 40%.

Автору удалось установить, что результатом заражения как биотрофным грибным патогеном, так и некротрофным патогеном было появление примерно 40% новых пептидаз, причем спустя 24 часа после заражения обоими патогенами происходит увеличение не только числа экспрессируемых протеиназ, но общей протеолитической активности в клетках растений. Интересно, что наряду с появлением ферментов из нескольких общих семейств, в случае биотрофной инфекции были индуцированы дополнительно также металлопротеиназы из семейств M17 и M20, в то время как в случае некротрофной – цистеиновые из семейств C14 и C26. Следует отметить значительное увеличение количества расщепляемых

белков в ответ на биотический стресс (в 1.5-2 раза) по сравнению со здоровыми растениями. При этом в раннем ответе пшеницы на заражение в расщеплении субстратов в клетке могут участвовать каспазо- и метакаспазо-подобные ферменты.

В процессе биотического стресса наблюдалась активация пептидаз, представляющих разные семейства. При этом впервые в этом исследовании была показана связь активности протеиназ из семейств M24 и A1 с ответом на заражение патогеном. Весьма интересным оказался и тот факт, что сайты автокаталитической или осуществляемой другими эндогенными пептидазами активации растительных протеиназ преимущественно не являются сайтами узнавания каспазо- или метакаспазо-подобных ферментов.

Исследование, в частности, активации папаин-подобной цистеиновой протеиназы тритикаина- α показало, что процессинг N-концевого продомена может происходить либо автокаталитически, либо в результате межмолекулярного взаимодействия, тогда как удаление C-концевого гранулинового домена происходит только автокаталитически. При этом окончательное созревание фермента, по-видимому, происходит в вакуоли при пониженном pH.

Проведенное диссертантом обсуждение результатов сделано умело, логично и интересно. А.В. Балакирева продемонстрировала в этом разделе свою эрудицию и умение использовать литературные данные для плодотворной научной дискуссии и обоснования определенной интерпретации своих экспериментальных результатов.

Однако к двум последним указанным разделам есть ряд вопросов и замечаний. 1) Почему нельзя было каждый из исследованных сортов пшеницы (различающихся устойчивостью к патогенам) заражать как биотрофным, так и некротрофным патогеном, что дало бы возможность увидеть разницу в ответе на каждый из патогенов при различной устойчивости к ним. 2) В табл.5 приведены потенциальные субстраты

каспазо- и метакаспазо-подобных протеиназ, чей гидролиз возможен в ответе растений на оба типа инфекции. А присутствуют ли какие-то из них или какие-либо другие идентифицированные субстраты в незараженных растениях? 3) Следовало бы в более осторожных выражениях говорить об успешности фракционирования, т.к. колориметрического измерения нитратов в супернатанте для этого явно недостаточно. 4) Можно дискутировать по поводу утверждения, сделанного в обсуждении, что количество субстратов для каспазо-подобных протеиназ в процессе заражения увеличилось незначительно. Если обратиться к рис.16Б и В, то можно видеть, что в случае биотрофного заражения количество потенциальных каспазных субстратов увеличилось в 2,8 раза, тогда как общее число субстратов эндогенных протеиназ в 1,9 раза, а в случае некротрофной инфекции в 1,7 раза и 1,5 раза соответственно.

Следует заметить, что указанные замечания носят непринципиальный характер и не меняют общей положительной оценки работы. В целом экспериментальный материал, полученный в настоящей работе, и сделанные на его основе выводы представляют значительный интерес и являются заметным шагом к пониманию роли пептидаз пшеницы в ответе растений на биотический стресс. Подводя итог рассмотрению диссертации А.В. Балакиревой, хотелось бы отметить, что эта работа является законченным научным исследованием и выполнена на высоком научно-методическом уровне. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, а сделанные на их основе выводы обоснованы. Основные результаты работы А. В. Балакиревой адекватно отражены в опубликованных печатных трудах. Автореферат диссертации полностью передает основное содержание диссертационной работы.

Таким образом, по объему полученного материала, глубине его анализа, достоверности и оригинальности полученных результатов и выводов, а также научной и практической значимости диссертационная работа А. В. Балакиревой отвечает требованиям установленным Московским

государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» (по биологическим наукам и критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Ее автор, Балакирева Анастасия Васильевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник Отдела белков растений Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», д.б.н.

Дунаевский Яков Ефимович

Контактные данные: тел.: 8 495-939-55-51, e-mail: dun@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена

диссертация: 03.00.03 – Молекулярная биология

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

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

