

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу Калачової Тетяни Анатоліївни
„Роль фосфатидилінозитол-залежних фосфоліпаз та ліпідкіназ у первинних
реакціях клітин рослин на стресові чинники навколошнього середовища та у
процесах розвитку”

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю
02.00.10 - біоорганічна хімія

Дисертаційна робота Калачової Тетяни Анатоліївни виконана у відділі молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України та в Інституту екології та наук про навколошнє середовище Парижу згідно науково-дослідної теми «Роль фосфоліпаз та антиоксидантних систем в гормональній та стрес сигналізації, а також за підтримки грантів уряду Франції та міжнародного фонду «Вишеград».

Актуальність выбраної теми. Дисертаційна робота Калачової Т.А. присвячена вивченю молекулярних механізмів ліпідного сигналінгу. В останні роки отримано немало експериментальних даних щодо ролі сигнальних молекул в формуванні адаптивних реакцій рослин на дію стресорів. Незважаючи на стрімке накопичення експериментальних даних з цієї проблематики, уявлення про механізми трансдукції сигналу в рослин досі фрагментарні. Зважаючи на те, що мембрана клітини є первинним сайтом сприйняття багатьох екзогенних сигналів хімічної, біологічної та фізичної природи, на особливу увагу заслуговують дослідження спрямовані на з'ясування механізмів трансдукції сигналів що залучають ліпідні молекули у якості вторинних посередників. Необхідність дослідження цих механізмів зумовлює актуальність обраної Т.А.Калачовою теми дисертаційної роботи, яка присвячена з'ясуванню ролі фосфоліпаз та ліпідкіназ в якості універсальних посередників при перебудові метаболізму клітин під час адаптації рослин до змін умов навколошнього середовища.

Ступінь обґрутованості та достовірності наукових положень та висновків. Дисертаційна робота є добре спланованою, її мета і завдання сформульовані автором чітко і конкретно. Робота викладена на 162 сторінках тексту, містить 45 рисунків та 6 таблиць. Робота оформлена за класичною схемою та містить усі необхідні розділи: вступ, огляд наукової літератури, розділи присвячені представленню та обговоренню результатів власних експериментальних досліджень, висновки та список цитованих публікацій, що складається з 205 найменувань. Акуратне оформлення дисертації, послідовне викладення матеріалу із доречним використанням схем та ілюстрацій сприяють розумінню головної ідеї роботи та сформульованих положень.

В огляді наукової літератури (10 сторінок) наведено сучасні уявлення про структуру, філогенетичну характеристику, біохімічні властивості та фізіологічну роль фосфоліпаз, діацилгліцеролкіназ та фосфатидилінозитолкіназ. Огляд літератури є органічним та логічним вступом, що поєднує всі розділи експериментальної роботи здобувана. В другому розділі роботи «Матеріали і методи» дисертант, серед іншого, описує об'єкти досліджень на основі модельної рослини *Arabidopsis thaliana* та умов їх культивування. В роботі застосовано коректні, сучасні методики, використання яких цілком відповідає поставленим у роботі завданням. Результати досліджень оброблені статистично, а їх достовірність не викликає сумніву. Використання сучасних методів та експериментальних підходів дозволило Калачовій Т.А. зробити аналіз отриманих даних та обґрунтувати їх наукове значення.

В цілому дисертаційна робота базується на результатах аналізу значного масиву власних результатів, отриманих за допомогою методів, що відповідають поставленій меті і завданням дослідження. Тому результати, висвітлені в експериментальних розділах дисертаційної роботи та їх аналіз дозволили сформулювати обґрутовані положення, які висвітлені у висновках, що базуються на виявленіх статистично достовірних ефектах.

Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. Експериментальну частину роботи представлено у чотирьох окремих підрозділах. У першому розділі наведено результати досліджень ролі ліпідних месенджерів у сигнальних каскадах, індукованих стрес-асоційованими фітогормонами (саліциловою та абзцизовою кислотами) у культурах клітин рослин. На модельній системі продихів Арабідопсису за допомогою простих та добре спланованих візуалізуючих експериментів автором доведено беззаперечну участь фосфоліпази D та її продукту фосфатидної кислоти у трансдукції сигналу саліцилової кислоти. Запропоновано схему каскаду, що включає елементи ліпідного сигналінгу та ферменти генерації активних форм кисню – НАДФН-оксидази.

У другому розділі автором наведено результати дослідження, що поєднують біохімічні та біоінформаційні підходи. Вперше виявлено та охарактеризовано кластери генів, що спільно регулюються саліциловою та абзцизовою кислотами із залученням вторинних посередників ліпідної природи – фосфатидилінозитолів та фосфатидної кислоти.

Третій розділ присвячено первинним реакціям рослинних клітин на дію бактеріальних еліситорів. Автор вивчала вплив пептиду флагеліну flg22 на динаміку фосфоліпідів суспензійної культури клітин та проростків Арабідопсису. Встановлено, що flg22 спричинює швидке накопичення фосфатидної кислоти та відповідне паралельне зниження вмісту фосфатидилінозитол-4,5-біфосфату, що виступає субстратом для фосфоліпаз С. За допомогою інгібіторного аналізу було встановлено участь діацилгліцеролкіназ і фосфатидилінозитол-залежних фосфоліпаз ФЛС у змінах балансу мембраних фосфоліпідів та швидкій продукції активних форм кисню. З використанням трансгенних ліній, дефектних за білками-компонентами рецепторного комплексу FLS2-BAK1 показано, що продукція фосфатидної кислоти може безпосередньо слідувати за рецепторним розпізнаванням флагеліну у сигнальному каскаді, однак передувати індукованій продукції активних форм кисню НАДФН-оксидазою RbohD.

Виявлено, що основним джерелом продукції фосфатидної кислоти виступає ізоформа діацилгліцеролкінази 5. Автором охарактеризовано роль цього ферменту у регуляції базального транскрипту клітин, у його флагелін-індукованих змінах експресії генів, накопиченні калози у апопласті та як наслідок - стійкості до біотрофного патогену *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000.

Четвертий розділ присвячено ролі фосфоінозитидів у морфогенезі кореневої системи рослин Арабідопсису. Роль фосфоінозитидів у сигнальних каскадах ауксину та цитокініну виявлено при дослідженні морфогенезу кореневої системи рослин, дефектних за двома генами фосфатидилінозитол-4-кіназ III типу (*pi4kb1b2*). Цей подвійний мутант характеризується пригніченням ростом та надмірним накопиченням саліцилової кислоти у вегетативних тканинах. Для відокремлення саліцилат-незалежних ефектів автором використано потрійний мутант *pi4kb1b2sid2*, що має додаткову мутацію у гені ключового ферменту біосинтезу СК - ізохоризматсинтази 1, ICS1. Виявлено, що рослини *pi4kb1b2* характеризуються пригніченням вегетативним ростом розетки та кореневої системи, а рослини *pi4kb1b2sid2* мають нормальній розвиток розетки, але вкорочений головний корінь порівняно з рослинами дикого типу. Автором досліджено реакцію на дію мікромолярних концентрацій ауксину та цитокініну у мутантів *pi4kb1b2* та *pi4kb1b2sid2*, виявлено також взаємозв'язок між рівнем фосфоінозитидів та чутливістю клітин до дії ріст-асоційованих фітогормонів.

Таким чином, провівши низку добре обґрунтованих, копітких і методично складних дослідів, Т.А.Калачова отримала значний фактичний матеріал, який відрізняється великою науковою вагомістю і новизною. Хочеться підкреслити вільне володіння дисеранткою новітньою інформацією літературних джерел і широке використання їх в обговоренні своїх власних результатів.

Про високий науковий рівень роботи Т.А.Калачової свідчить те, що результати роботи неодноразово доповідались на престижних світових,

вітчизняних форумах та надруковані у міжнародних рецензованих журналах з високим імпакт-фактором. Такий високопрофесійний підхід до апробації наукових даних визначає практичну відсутність (є несуттєві технічні та редакційного плану помилки в рукопису) зауважень до даної роботи.

Висновок. За актуальністю, якістю виконання, новизною, теоретичним і практичним значенням, рівнем обґрунтованості та достовірностю наукових положень і висновків, дисертаційна робота Калачової Тетяни Анатоліївни «Роль фосфатидилінозитол-залежних фосфоліпаз та ліпідкіназ у первинних реакціях клітин рослин на стресові чинники навколошнього середовища та у процесах розвитку» відповідає вимогам п., 11, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року (зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук,
в.о.зав. кафедри біології рослин
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка, професор



Н.Ю. Таран

ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР НДЧ
КАРАУЛЬНА Н. В.
d 9 . 05 . 2017 р.




Н.Ю. Карап'я