

**ОТЗЫВ**  
**официального оппонента**  
**на диссертацию Виктории Вадимовны Рябовол**

«Характеристика морфологических, биохимических и молекулярных признаков аутофагии в  
корнях *Triticum aestivum* при стрессе»,

представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - «физиология и биохимия  
растений»

Диссертационная работа В.В. Рябовол посвящена исследованию аутофагии в клетках корней растений пшеницы путем исследования ее морфологических, биохимических и молекулярных проявлений, возникающих при ряде стрессов. Процесс аутофагии играет чрезвычайно важную роль в живых организмах, связанную, в норме, с удалением поврежденных макромолекул и органелл, а также при программированной клеточной смерти. Вместе с тем, этот процесс у растений изучен явно недостаточно, как в плане характеристики основных его участников, так и основных стадий самого процесса и условий, вызывающих аутофагию. Поэтому тема диссертационной работы В.В. Рябовол является, несомненно, актуальной.

В диссертационной работе поставлены и успешно решены следующие задачи:

1. Анализ образования аутофагосом в клетках корней пшеницы в условиях окислительного и раневого стрессов.
2. Исследование влияния ингибиторов электрон-транспортной цепи митохондрий на образование аутофагосом и активность ряда генов, кодирующих ключевые белки аутофагии.
3. Характеристика основных стадий образования и функционирования аутофагосом.
4. Характеристика гена, кодирующего один из основных белков аутофагии, - *TaATG8g*.
5. Получение рекомбинантного белка *TaATG8g* и анализ его структуры с помощью экспериментальных и биоинформатических методов.

Следует отметить, что решение поставленных задач имеет важное значение для биохимии и физиологии растений.

Экспериментальной части диссертации предпослан Обзор литературы, посвященный описанию явления аутофагии, его роли и основных участников этого процесса у организмов, где этот процесс изучен – у дрожжей и млекопитающих. Вместе с тем, обзор включает в себя данные, полученные и при исследовании растительных организмов, что позволяет

диссертанту проводить параллели, давать критические оценки существующего уровня знаний и формулировать принципиальные вопросы, требующие решения. Обзор литературы содержит всю информацию, необходимую для проведения собственных исследований, и свидетельствует о глубоком понимании диссертантом состояния дел в данной области. Большое количество ссылок на работы других авторов, включая самые последние публикации, также свидетельствует о тщательной проработке темы исследования. Обзор написан ясно, логично, хорошим интеллигентным языком и снабжен достаточным количеством иллюстративного материала. Впрочем, это относится и ко всей диссертации в целом.

Глава «Объекты и методы исследований» написана достаточно подробно для того, чтобы можно было воспроизвести эксперименты, а заодно и составить представление о широком арсенале методов, которыми владеет диссертант. Немного смущает утверждение, что Strep-Tag позволяет очищать белки с помощью металлоаффинной хроматографии (стр. 58), но это, видимо, описка.

Глава «Результаты и их обсуждение» последовательно описывает причины, побуждающие диссертанта задавать тот или иной вопрос природе, способы решения конкретной задачи, собственно результат исследования и его интерпретацию. Основные результаты, полученные в диссертационной работе, состоят в следующем.

При индукции окислительного стресса в интактных корнях пшеницы В.В. Рябовол обнаруживает повышение уровня активных форм кислорода, а также индукцию образования аутофагосом. Попутно диссертант детектирует усиление экспрессии генов ряда белков аутофагии (*ATG*-генов).

Затем В.В. Рябовол обнаруживает, что и при раневом стрессе корней происходит индукция аутофагии (образование аутофагосом и индукция экспрессии ряда *ATG*-генов) и, параллельно, накопление активных форм кислорода. Интересно, что процесс носит двустадийный характер. На ранней стадии (2 часа после индукции стресса) все отмеченные выше признаки уже наблюдаются, но клетки остаются живыми еще долгое время. Гибель клеток выявляется на существенно более поздней стадии (24-48 часов), и при этом диссертант детектирует наличие аутофагосом, высокий уровень активных форм кислорода и высокий уровень мРНК *ATG*-генов. Правда, заключение автора о том, что «наблюдается значительное повышение уровня экспрессии *ATG*-генов при 24-48 час. инкубации отсеченных корней» (стр. 74) представляется мне не совсем точным. Вряд ли в мертвых клетках транскрипция осуществляется эффективно (если вообще происходит). Скорее, повышенный уровень соответствующих мРНК является следствием усиления экспрессии генов в предыдущий

период (в интервале 12-24 час.). К слову, Рис. 12 в диссертации не соответствует подписи к нему, но, к счастью, эта ошибка исправлена в автореферате.

Поскольку В.В. Рябовол видит корреляцию между образованием активных форм кислорода и индукцией аутофагии при стрессах, она затем исследует, как ингибирование различных комплексов, входящих в состав электрон-транспортной цепи митохондрий, сказывается на аутофагии в клетках пшеницы. Автор обнаруживает, что ингибитор комплекса III (считающегося основным генератором активных форм кислорода в митохондриях) наиболее эффективно активирует аутофагию, повышает содержание перекисных соединений и снижает жизнеспособность клеток. Таким образом, диссертант выявляет взаимосвязь между дисфункцией митохондрий и индукцией аутофагии.

Исследование ультраструктуры клеток корней пшеницы, в которых индуцирован процесс аутофагии, проведено диссертантом на высоком уровне. Оно позволило выявить основные стадии образования и функционирования аутофагосом и предположить участие эндоплазматического ретикулума в этом процессе.

Наконец, В.В. Рябовол охарактеризовала один из основных белков аутофагии – ТаATG8. С этой целью она амплифицировала и клонировала ген и кДНК ТаATG8g и продуцировала соответствующий рекомбинантный белок в клетках *E. coli*. Правда, автор умалчивает, почему из десятка генов *ATG8* был выбран именно этот: то ли он был единственным идентифицированным геном (кДНК) на момент начала исследований, то ли чем-то понравился больше, чем остальные.

Несколько небольших замечаний по этой части работы. Первое: заключение о том, что ген *ATG8g* состоит из пяти экзонов и четырех интронов, я бы делал с осторожностью, поскольку, как я понял, оно следует из сравнения нуклеотидных последовательностей белок-кодирующих областей кДНК и гена. Но интроны могут встречаться также и в 5'- и 3'-нетранслируемых областях, которые не сравнивались. Второе: Рис. 25 диссертации я счел бы излишним, но раз уж он помещен, то не смущает ли диссертанта, что та ДНК, которая обозначена как «линейная форма плазмиды», имеет длину ~ 18 тысяч пар нуклеотидов? Ну и если придирается к терминологии, то не бывает «первичной последовательности», бывает «первичная структура».

Получив рекомбинантный белок ТаATG8g и выделив его в индивидуальном виде из клеток бактерий, В.В. Рябовол осуществила его характеристику с помощью целого ряда физико-химических и биоинформатических методов (наличие элементов вторичной структуры, конформация белка, компьютерное моделирование пространственной структуры). Это позволило диссертанту сделать ряд предположений об организации молекулы белка и

возможных способах его функционирования. Все это очень хорошо и интересно. Честно говоря, в этом разделе работы мне не хватило только одного: чтобы автор продуцировал рекомбинантный белок GFP-TaATG8g в растениях и убедился в том, что белок маркирует аутофагосомы. Впрочем, такие исследования наверняка запланированы диссертантом на будущее.

Следует отметить, что сделанные в отзыве замечания не снижают ценности представленной работы. Оценивая диссертационную работу в целом, следует заключить, что В.В. Рябовол сделала много нового и интересного. Полученные результаты являются шагом вперед в изучении аутофагии у растений и закладывают основу для дальнейших исследований. Оригинальность и научная новизна работы, равно как и обоснованность выводов, сомнений не вызывают. Диссертация представляет собой законченное научное исследование, выполненное на высоком уровне.


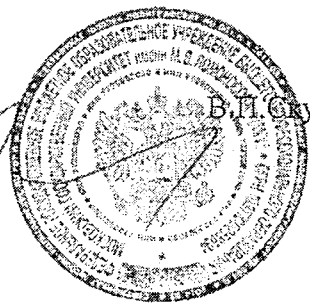
Основные результаты диссертационной работы отражены в публикациях, три из которых являются статьями из списка ВАК. Содержание автореферата полно отражает содержание диссертации. Рассмотрение результатов работы и публикаций по теме в совокупности свидетельствуют о том, что диссертация отвечает требованиям п. 7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям. Считаю, что ее автор Виктория Вадимовна Рябовол заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений».

25 августа 2014 г.

Заведующий отделом химии и биохимии нуклеопротеидов  
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова,  
доктор химических наук, профессор  
Почтовый адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40.  
Тел.: +7(495) 939-41-25; электронная почта: varta@genebee.msu.ru

  
А.Б. Вартапетян

Директор  
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова,  
академик РАН, профессор

  
  
В.И. Скулачев

*Смирновой Анастасии*  
5.09.2014