

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА К.Б.Н. О.В. ВОЙЦЕХОВСКОЙ
на диссертационную работу Рябовол Викторнии Вадимовны «Характеристика
морфологических, биохимических и молекулярных признаков аутофагии в корнях
Triticum aestivum при стрессе» по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия
растений»,

представленную к защите 18 сентября 2014 г. в диссертационном совете Д 002.005.01 при
Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Казанский институт
биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ
КазНЦ РАН) по адресу 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31.

Аутофагия (аутофагия) представляет собой один из важнейших катаболических путей в эукариотической клетке. Исследования аутофагии начинались с голодающих клеток животных, но к настоящему времени стало ясным, что аутофагия и аутофагический аппарат участвуют практически во всех сторонах жизнедеятельности клеток, включая, например, механизмы клеточной репарации, иммунный ответ, малигнизацию и программированную клеточную смерть. Изучение процессов аутофагии у растений в настоящее время представляет собой бурно развивающуюся область науки. Вначале исследования ограничивались изучением аутофагии, индуцированной недостатком питательных веществ, либо старением растения. Однако, работы последнего десятилетия показали, что процессы аутофагии в растительной клетке, как и у животных, принимают непосредственное участие в широком спектре важнейших функций клетки. Аутофагия играет ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза в норме и при окислительном стрессе, является необходимым звеном в защите растений от патогенов и в процессе программированной клеточной смерти. Вместе с тем, наши знания о цитологических, генетических и биохимических механизмах аутофагии у растений существенно отстают от исследований на клетках животных и дрожжей. Поэтому тема диссертационной работы Викторнии Вадимовны Рябовол весьма актуальна. Выполненное ею исследование по необходимости должно было быть комплексное, так как призвано восполнить недостаток знаний о базовых цитологических, биохимических и молекулярных признаках, характеризующих процесс аутофагии в растительной клетке. Автор блестяще справилась с поставленной сложной задачей. Следует отметить, что для российской науки о растениях данная работа является пионерской, так как аутофагия у растений до сих пор главным образом изучалась в зарубежных лабораториях. О высокой актуальности выбранной темы исследования свидетельствует и то, что работа, выполнявшаяся в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН, была поддержана рядом грантов.

Диссертационная работа оставляет стройное и логичное впечатление. Для достижения поставленной цели автором был использован ряд современных методов цитологии, молекулярной биологии и биохимии. Главный фокус работы, и, на мой взгляд, наиболее важные и фундаментальные результаты, полученные автором, связаны с характеристикой белка-гомолога ATG8 – одного из ключевых компонентов аутофагического аппарата эукариотической клетки – у объекта исследования – пшеницы *Triticum aestivum*.

Диссертация состоит из Введения, трех глав – «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты и обсуждение» - а также Заключения, Выводов и Списка литературы. Диссертация написана хорошим языком и стилем, и ее безусловным

достоинством являются лаконичность и четкость формулировок. Во Введении подчеркивается взаимосвязь процессов автофагии у растений с редокс-статусом клеток, логично и конкретно обосновываются задачи (5 задач), решение которых позволяет достичь поставленную диссертантом цель исследования. Обзор литературы включает 38 страниц, он логично построен и разбит на пять разделов. В обзоре автор, демонстрируя широкий кругозор и прекрасные знания о состоянии современных исследований автофагии у растений, дает анализ основных «точек роста» этой области к настоящему времени, и вводит читателя в круг имеющихся нерешенных проблем. Можно было бы только пожелать, чтобы подписи к рисункам в Обзоре литературы были более подробными: в особенности рисунок 1 «не читается» вовсе. Несколько портят впечатление опечатки и ошибки: например, фагофор выслан, а не «выстелен» как у автора, мембраной (стр. 24); правильное название нейродегенеративного заболевания, обусловленного дефектами митофагии, паркинсонизм, а не «паркиннизм» (стр. 29). Вызывает некоторое удивление, что в обзоре литературы автор не касается статьи D. Klionsky с соавторами «Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy» (2008; более поздний вариант той же статьи опубликован в 2012 г.). Данная работа представляет собой весьма полезный, фундаментальный и к настоящему времени наиболее полный свод методических рекомендаций по экспериментальному изучению автофагии (в том числе у растений), выработанный коллективом автором, в том числе ведущими мировыми специалистами в этой области, на основании опыта собственных исследований. Хотя эта работа лишь косвенно касается теоретических вопросов, рассматриваемых в обзоре, она дает тщательное обоснование границ достоверности методических подходов, используемых в исследованиях автофагии, и помогает определить допустимый диапазон интерпретации результатов, полученных с помощью этих подходов. Остается неясным, знаком ли автор с данной статьей; если нет, то, возможно, этим объясняются небольшие шероховатости, связанные с методической частью диссертационной работы (см. ниже, в разборе главы «Объекты и методы исследования»).

Глава «Объекты и методы исследования» дает описание спектра методов, использованных для решения поставленных задач. Он весьма впечатляет, а также показывает высокий уровень эрудиции автора, его способность ориентироваться в разных областях науки о растениях и интегрировать полученные данные в целостную картину. Все выбранные методы адекватны поставленным задачам. Однако, в некоторых случаях приведенные в диссертации описания методов и рабочих протоколов слишком кратки, и остаются вопросы к диссертанту. Наиболее существенными для интерпретации полученных автором результатов считаю следующие вопросы.

(1) Чем обоснован выбор для определения содержания перекиси водорода в растительной ткани метода, основанного на растирании тканей и измерениях в гомогенате? Как известно, раневой стресс на ранних стадиях сопровождается усиленной продукцией активных форм кислорода. Гомогенизирование интактной растительной ткани по праву может быть приравнено к очень сильному раневому стрессу; не влиял ли этот метод сам по себе на уровень измеряемого в растительной ткани пероксида водорода? Если да, то в каком диапазоне лежит возможная привнесенная ошибка?

(2) При описании метода ПЦР в реальном времени, использованного для количественной оценки уровней экспрессии генов, автор не указывает, на каком основании было выбрано количество циклов 40. Также остается неясным, учитывалась ли

при расчетах эффективность использованных для каждого гена праймеров. Учет эффективности может изменить оценку уровня экспрессии, т.е. кажущаяся разница в уровнях экспрессии изучаемых генов может исчезнуть при введении учета эффективности прайминга. Если соответствующая предварительная методическая работа по оценке эффективности праймеров, а также по определению количества циклов, необходимых для детекции продукта в линейном диапазоне зависимостей концентрации матрицы от скорости реакции, не проводилась, то возможно ли, что некоторое несоответствие между визуальными различиями в уровне автофагии и различиями на уровне экспрессии автофагических генов (см. ниже при разборе главы «Результаты и обсуждения») объясняется методической неточностью в определении уровней экспрессии автофагических генов?

(3) Интересно было бы узнать, чем вызван выбор пшеницы в качестве объекта исследования. Этот вопрос связан с тем, что в качестве доказательства индукции автофагии при раневом и окислительном стрессах автор использует такое сочетание методов, как (а) окраска *Lysotracker red*, выявляющая органеллы с кислым содержимым, такие как автофагосомы и автолизосомы; (б) блокирование появления этих специфических для автофагии органелл ингибитором автофагии - 3-метиладенином; (в) оценка уровня экспрессии автофагических генов. Между тем, если бы автор выбрал в качестве объекта исследования арабидопсис, то это дало бы ему возможность изучить участие автофагии в ответе растений на исследуемые виды стрессов генетически - с использованием дефектных по автофагии мутантов, и тем самым расширить доказательную базу для сделанных заключений.

(4) Протокол использования красителя Эванс синий для оценки жизнеспособности клеток в том виде, в котором он приведен в диссертации, не позволяет судить о том, насколько корректно был использован данный метод, а именно, проводилась ли нормализация измеренной оптической плотности отмытого раствора по отношению к общему свежему или сухому весу корней?

(5) В описании методов автор указывает, что была проведена статистическая обработка результатов с использованием *t*-критерия Стьюдента при $P \leq 0,05$. Однако, нигде в работе - ни в таблицах, ни на графиках - не указаны значения *t*-критерия и не помечены достоверно различающиеся значения (см. ниже при обсуждении результатов). Не приводятся и оригинальные данные, на основе которых читатель при необходимости мог бы сам оценить статистическую достоверность различий между усредненными значениями в сравниваемых вариантах.

Автор удачно объединил описание полученных результатов и их обсуждение в одну главу. Учитывая объем работы и разносторонность полученных данных, такая компоновка позволила избежать затянутостей и помогла автору выдержать единую линию изложения. Результаты, полученные диссертантом, полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Большинство из них получено впервые для растительных организмов.

Первая часть результатов показывает индукцию процесса автофагии при окислительном стрессе. Автор с помощью цитологических и молекулярных методов убедительно демонстрирует участие автофагии в ответе клеток корня пшеницы на стрессе, вызванный экзогенным паракватом. Некоторые вопросы вызывают данные, представленные в Табл. 3, поскольку отсутствует информация об их статистической обработке. Например, действительно ли различия в содержании перекиси водорода в

контрольных ($4,7 \pm 1,2$) и опытных ($7,7 \pm 3,1$) корнях статистически значимы? К сожалению, мне не удалось найти ответ на этот вопрос в диссертации; автор, тем не менее, интерпретирует полученные данные, по-видимому, как статистически достоверное увеличение содержания пероксида водорода в клетках под действием параквата по сравнению с контролем (стр. 66). Кроме того, в той же Таблице 3 указанные величины представлены в размерности мкМ (= микромоль в литре) на мг сырого веса. Очевидно, имелись в виду микромоли в мг сырого веса? В целом, однако, представленные в этом разделе диссертации результаты не оставляют сомнений в справедливости заключений, сделанных автором на их основе.

Как известно, раневой стресс связан с продукцией активных форм кислорода, и следующая часть выполненных автором исследований, где изучается вопрос, является ли автофагия частью ответа растений на поранение, представляется вполне логичной. В результате проведения экспериментов автор впервые смог показать, что в растениях при раневом стрессе индуцируется автофагия. В пользу этого предположения свидетельствует формирование в цитозоле автофагосом одновременно с появлением активных форм кислорода, которое сопровождалось повышением уровня экспрессии автофагических генов. К сожалению, автор не указала, блокировал ли специфический ингибитор автофагии 3-метиладенин эти реакции растений на раневой стресс. Кроме того, обращает на себя внимание некоторое кажущееся несоответствие динамики индукции автофагосом (детектируемых с помощью *Lysotracker red*, Рис. 11) и динамики экспрессии автофагических генов (Рис. 12) при поранении. В то время как экспрессия генов *TaATG4* и *TaATG8g* равномерно увеличивалась и за 48 часов от начала поранения достигала восьмикратного повышения относительно исходного уровня, число автофагосом, представленных на Рис. 11 для точки 6 часов от начала поранения, визуально превышает число автофагосом, представленных для точки 48 часов. Было бы интересно узнать, чем может объясняться такое расхождение с точки зрения диссертанта.

В гетеротрофной растительной клетке, каковыми являются клетки корня, важная роль в энергетическом обмене, а также в продукции активных форм кислорода, принадлежит митохондриям. В диссертационной работе автор впервые для клеток растений исследовал взаимосвязь между процессами митохондриального электронного транспорта и уровнем автофагии. С помощью ингибиторного анализа выявлено, что ингибирование участков митохондриальной ЭПЦ, ответственных за снятие переноса энергии пула убихинонов, вызывает формирование автофагосом и активацию экспрессии автофагических генов. Такими участками в растительных митохондриях являются цитохромный *bc₁* комплекс и альтернативная оксидаза. Очевидно, что и в данной экспериментальной системе триггером автофагии, вероятнее всего, выступает окислительный стресс, возникающий вследствие образования супероксид-радикала при передаче электронов с семиубихинонов на кислород. Однако, вывод автора о вовлечении альтернативной оксидазы в регуляцию автофагии на основании только лишь полученных автором результатов представляется несколько преувеличенным. Ведь если следовать этой логике автора, то любые клеточные механизмы, так или иначе способствующие снижению или повышению уровня активных форм кислорода в клетке, можно отнести к регуляторам автофагии. В таблице 4 приведены количественные оценки содержания перекиси водорода, уровня перекисного окисления липидов и смертности клеток при воздействии различных ингибиторов. Здесь, как и в предыдущей таблице,

встает вопрос о статистической значимости выявленных различий. В данном разделе есть одна опечатка – на стр. 82 ошибочно приведена ссылка на рисунок 11 вместо рисунка 14.

Исключительно красивой и очень интересной частью работы является характеристика последовательных этапов образования автофагосом в растительных клетках, выполненная автором с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Эти данные, в частности, вовлечение эндоплазматического ретикулума в образование фагофора, представляют большой интерес для исследователей автофагии у растений. Стадии образования автофагосом были подробно изучены в клетках корня пшеницы при действии окислительного стресса. К сожалению, автор забыла упомянуть, каким образом в этих экспериментах создавался окислительный стресс. Информация об этом отсутствует как в соответствующем разделе главы «Результаты и обсуждение», так и в главе «Объекты и методы исследования». Только по косвенным признакам можно полагать, что по крайней мере в эксперименте, представленном на рисунке 16д, окислительный стресс был вызван прооксидантом (по всей видимости, паракватом, так как другие прооксиданты в работе не упоминаются). Между тем, на мой взгляд, это довольно существенное упущение, так как по состоянию исследований автофагии на данный момент не является очевидным, что морфология образования автофагосом будет одинаковой при любом виде стресса. Хотелось бы пожелать автору учесть это замечание при публикациях полученных данных.

Важнейшая, и наибольшая по объему, часть работы посвящена подробной характеристике белка TaATG8g пшеницы. Автор начал с клонирования кодирующей области гена *TaATG8g*, чего было бы достаточно для проведения биоинформационного анализа и некоторых выводов о структуре и филогенетическом положении TaATG8g. Однако, в рамках диссертации автором была проведена колоссальная работа по получению рекомбинантного белка TaATG8g путем гетерологичной экспрессии, его очистке и характеристике с использованием инфракрасной спектроскопии и ядерного магнитного резонанса. В пределах аминокислотной последовательности TaATG8g автором выявлены основные мотивы первичной структуры, отвечающие за специфические взаимодействия белков ATG8 с клеточными компонентами и автофагическим аппаратом. Была определена пространственная структура TaATG8g. Характеристика белка-гомолога ATG8 для растений выполнена впервые. Полученные В.В. Рябовол данные подтверждают высокий уровень эволюционной консервативности основных структурных компонентов автофагического аппарата эукариот.

Все сделанные автором выводы обоснованы и не вызывают сомнений.

В целом диссертационная работа Рябовол В.В. производит выдающееся впечатление, прежде всего, значимостью и новизной полученных результатов. Эти результаты безусловно будут интересны для ученых из разных областей науки о растениях. Высказанные в отзыве замечания ни в коей мере не умаляют значения диссертационной работы и не снижают произведенного общего впечатления.

Материалы диссертационной работы неоднократно докладывались на Всероссийских и международных конференциях. Автореферат диссертации Рябовол В.В. полностью отражает содержание диссертации. По теме диссертации автором опубликовано три научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК, которые вполне отражают полученные в ходе работы над диссертацией результаты. Однако, можно ожидать, что за этими статьями последуют еще публикации, так как выполненное исследование определенно имеет научный и «публикационный» потенциал.

Оценивая работу в целом, можно заключить, что по объёму проведённых исследований, по научной значимости полученных результатов, по разнообразию и адекватности применённых методов исследования, диссертационная работа Рябовол В.В. представляет собой завершённое, важное и интересное исследование. Эта работа и написанная диссертация вполне соответствуют требованиям, предъявляемым к работам, представляемым к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03. 01. 05 - «Физиология и биохимия растений», а сама Рябовол В.В. заслуживает присуждения этой степени.

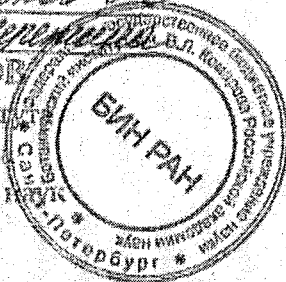
03 сентября 2014 г.

Ольга Владимировна Войцеховская
Кандидат биологических наук,
Старший научный сотрудник лаборатории экологической физиологии
ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова
Российской академии наук
197376 Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, 2
(812) 372-54-00
ovoitse@yandex.ru

Войцеховская

/О.В.Войцеховская/

Подпись руки *Войцеховской О.В.*
ЗАВЕРЯЮ *Мих. ср. Курочкин*
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук



С успехом ознакомлена *fel*
5.09.2014