

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института физиологии
растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук
на корр. РАН
Вл.В. Кузнецов



11 августа 2014 г.

Отзыв ведущей организации
о диссертационной работе РЯБОВОЛ ВИКТОРИИ ВАДИМОВНЫ
«Характеристика морфологических, биохимических и молекулярных
признаков аутофагии в корнях *Triticum aestivum* при стрессе»,
представленной на соискание учёной степени
кандидата биологических наук по специальности
03.01.05 – физиология и биохимия растений

В клетках всех эукариот, включая растения, поддержание внутриклеточного гомеостаза обеспечивается за счёт функционирования молекулярных механизмов повторного использования макромолекул и органелл. Небольшие коротко живущие белки подвергаются убиквитинированию и деградируют по протеосомному пути, тогда как деградация долго живущих белков, белковых агрегатов и органелл происходит посредством аутофагии. Сегодня изучение этого процесса, первоначально обнаруженного в клетках дрожжей, а в дальнейшем обстоятельно изученного в клетках млекопитающих, привлекает внимание физиологов и биохимиков растений. Ещё десять лет назад изучение аутофагии у растений, главным образом, фокусировалось на событиях, происходящих при старении или в связи с недостатком элементов питания. Сейчас представления о функциональной значимости аутофагии у растений существенно расширились, поскольку удалось установить, что у растений аутофагия имеет место, как при биотических и абиотических стрессах, так и при благоприятных условиях роста и развития. Большинство работ, посвящённых изучению аутофагии, выполнено на модельном растении *Arabidopsis thaliana*, тогда как за пределами этой богатой генетическими ресурсами модели остаётся ещё много неисследованного. Так, оказалось, что некоторые основные гены, белковые продукты которых у других эукариот обеспечивают осуществление аутофагии, у растений отсутствуют. Напротив, у растений имеются мультигенные семейства аутофагических генов, а процесс аутофагии может быть ещё и селективным. Хотя исследования аутофагии у растений уже достигли своего совершеннолетия, всё ещё недостаточно сведений об аутофагических белках и кодирующих их генах, особенно за пределами арабидопсисной модели; не выявлены многие цитологические характеристики аутофагии в растительных клетках, включая последовательные стадии формирования аутофагосом и роль в этом процессе отдельных органелл. Всё сказанное убеждает, что изучение цитологических, биохимических и молекулярных механизмов аутофагии в растениях, которому посвящена рецензируемая работа, безусловно, актуально.

Диссертация В.В. Рябовол построена по традиционному плану. Рукопись объёмом 150 страниц включает краткое введение в проблему, которой посвящено исследование, подробный обзор литературы о практически всех аспектах, связанных с изучением

аутофагии в клетках эукариот, описание объекта диссертационного исследования и методов, использованных для достижения цели работы, изложение результатов исследований и обсуждение этих результатов. Диссертацию завершают заключение, выводы и список использованной в диссертации литературы: 272 публикации, которые появились, по преимуществу, в последние годы. На трёх последних страницах расположилось приложение.

Анализ привлечённой диссертантом литературы охватывает исследования молекулярных механизмов и особенностей аутофагии в клетках эукариот. Подробно изложены имеющиеся в литературе данные о белках, вовлечённых в аутофагию, биогенезе аутофагосом, типах селективной и неселективной аутофагии. В *обзоре литературы* (38 страниц, 6 рисунков, 1 таблица) критично рассмотрены сведения о физиологической роли аутофагии в растениях, где подчёркнута важная роль этого катаболического процесса как в росте и развитии растений, так и при стрессе. Поскольку индуктором аутофагии у растений является, в том числе, окислительный стресс, то вполне оправдано особое внимание диссертанта к описанию токсических эффектов активных форм кислорода (АФК) и окислительным модификациям клеточных макромолекул. В заключительной части обзора литературы анализируются результаты исследований программируемой клеточной смерти в растениях и роли аутофагии в этом явлении. В.В. Рябовол анализирует существующие представления о механизмах гибели клеток, которые исследованы куда слабее, и подчёркивает общность и различия этих механизмов в растениях и млекопитающих на морфологическом, биохимическом и генетическом уровнях. На основании анализа литературы мы вместе с диссертантом приходим к заключению, что решение задач, сформулированных в работе, позволит приблизиться к пониманию механизмов, которые на клеточном и молекулярном уровнях обеспечивают осуществление аутофагии в клетках растений.

Литература, относящаяся к теме диссертации, огромна, и В.В. Рябовол справилась с нелёгким выбором для своего обзора наиболее важных сводок и специальных исследований.

Далее на 16 страницах представлена информация об использованных при выполнении диссертационной работы *методических приёмах*. В качестве объекта своего исследования В.В. Рябовол выбрала отрезки (6-8 мм) апикальной части корня проростков яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. Такой выбор представляется важным, поскольку кроме растений риса у других важных для человечества видов растений аутофагия ранее не изучалась. В.В. Рябовол подробно описала широкий спектр методов, применённых в работе. Для решения поставленных задач использованы физиологические подходы, биохимические методы анализа редокс-статуса клеток, методы оценки протеазной активности и жизнеспособности, конфокальная микроскопия для визуализации аутофагосом и АФК, электронная микроскопия для анализа стадий формирования аутофагосом, молекулярно-биологические подходы, включая клонирование, получение и очистку рекомбинантного белка, а также методы анализа структуры белка при помощи ИК-спектроскопии и ^1H - ^{15}N ЯМР-спектроскопии. Все применённые в работе методы с разной степенью детализации описаны в главе «Объекты и методы исследования» (1 рис., 1 таблица).

Существенная часть работы В.В. Рябовол связана с компьютерным моделированием структуры белков, математическим, статистическим и биоинформатическим анализом последовательностей белков и генов. Здесь всё кратко, но чётко и конкретно: все интернет ресурсы и программы названы, приведены ссылки на соответствующие источники из литературы.

В целом, методическая часть диссертационной работы В.В. Рябовол выглядит более чем убедительно. Позволю себе, тем не менее, заметить, что

- в 2.1. допущена, скорее, досадная оплошность. Здесь диссертант пишет об использовании в качестве прооксиданта 10-мкМ параквата, тогда как все результаты относятся к 100 мкМ.

- в 2.6. стоило бы написать, как процессировали изображения, полученные при конфокальной микроскопии.

- в 2.14. написано, что «денатурированный лизат центрифугировали при 30 тыс. об/мин, 4°C в течение 30 ч». Здесь, определённо, ошибка. Добавим, что при описании режимов центрифугирования следовало бы использовать не об/мин, а величину ускорения (*g*).

- в 2.17. стоило бы подробнее написать об использованных антителах против ATG8: моно/поликлональные, против полноразмерного белка, если против фрагмента, то какого.

Теперь обратимся к лучшей, на наш взгляд, главе диссертации, а именно: к главе «*Результаты и Обсуждения*». В ней на 47 страницах изложены результаты работы В.В. Рябовол. Их иллюстрируют 31 рисунок и три таблицы. Подчеркну, что экспериментальное исследование, составляющее основу диссертации, выполнено на высоком уровне, а его результаты, безусловно, оригинальны и приоритетны.

Экспериментальную часть работы условно можно разделить на несколько этапов. Сначала В.В. Рябовол показала, что в клетках растений индукция аутофагии, сопровождающаяся образованием аутофагосом и усилением экспрессии аутофагических генов (*ATG*), происходит при действии факторов, влияющих на редокс-статус клеток. Сейчас известно, что молекулярный механизм генерации АФК при действии на растения параквата и пероксида водорода отличаются. Полученные В.В. Рябовол данные подтверждают это соображение. Действительно, она показала, что активация аутофагии при действии параквата происходит вследствие продукции АФК. Это важное заключение находит дальнейшее подтверждение в экспериментах с использованием митохондриальных ядов. Учитывая центральную роль митохондрий как АФК-образующих и энергопродуцирующих органелл в нефотосинтезирующих клетках, изучение роли митохондрий в регуляции аутофагии – крайне важная и увлекательная задача будущих исследований, надеемся, самой Виктории Вадимовны.

Установлено, что у растений аутофагия инициируется в ответ на патогены, при этом её медиаторами являются АФК, генерируемые, в том числе на плазмалемме, в результате работы НАДФН оксидазы. Раневой стресс, вызываемый либо механическим повреждением, либо являющийся результатом атаки со стороны патогена или насекомых, – своего рода мостик между биотическим и абиотическим стрессами. Моделирование раневого стресса позволило В.В. Рябовол впервые показать, что аутофагия индуцируется при поранении. Поскольку в литературе активно обсуждается вопрос о роли аутофагии в выживании и/или гибели клеток, то можно заключить, что результаты В.В. Рябовол свидетельствуют в пользу, скорее, двойственной роли аутофагии. В связи с этой частью работы хотелось бы задать вопрос и сделать замечания:

- почему индукция аутофагии на начальном этапе раневого стресса не сопровождается стимуляцией экспрессии *ATG*?

- полученные результаты могли бы быть убедительнее, если бы Виктория Вадимовна привела цифры, соответствующие количеству LT-позитивных структур (рис. 11), поскольку сделанное заключение имеет принципиальный характер.

- на рис. 12 автор «обещает» показать экспрессию *ATG* при раневом стрессе, а в действительности мы видим результаты влияния ингибиторов ЭТЦ митохондрий на экспрессию *ATG*. В автореферате (рис. 5) такой ошибки нет.

- в этой части работы было бы целесообразно показать не только изменение экспрессии *ATG*, но и изменения количества соответствующего белка, тем более, что использованные в работе коммерческие антитела показали кросс-реактивность с белком пшеницы *TaATG8g*.

Показав на клеточном уровне наличие аутофагосом, В.В. Рябовол проследила за этим многоэтапным процессом на ультраструктурном уровне. Для растений пшеницы ей удалось впервые описать основные последовательные этапы формирования аутофагосом. Учитывая сложность идентификации различных стадий этого процесса на ультраструктурном уровне, исследование, проведённое в настоящей работе, представляется чрезвычайно детальным.

Далее следует самая захватывающая часть работы: изучение структуры маркерного белка аутофагии ATG8. Следует заметить, что найденные у всех эукариот гены *ATG*, кодируют белки, различающиеся функционально. Для своего исследования В.В. Рябовол выбрала (1) белок ATG8, который важен как для образования аутофагосом, так и для их слияния с вакуолярной мембраной, а также (2) белок ATG4, модифицирующий ATG8, что необходимо не только для образования аутофагосомы, но и для повторного использования ATG8, то есть, для регуляции, собственно, аутофагии. Поскольку геном пшеницы полностью не секвенирован, то В.В. Рябовол оказалась в непростой ситуации, так как нельзя было исключить, что ATG8 пшеницы кодируются несколькими генами. Например, у *Arabidopsis* имеется девять генов, кодирующих изоформы ATG8. Тем не менее, В.В. Рябовол справилась и с этой задачей. Она клонировала ген *TaATG8g* и показала, что его структура соответствует *ATG8* других растений.

Имея в руках клонированный ген целевого белка, В.В. Рябовол получила, очистила и охарактеризовала структуру *TaATG8g*. Эта работа потребовала от диссертанта мастерovitости, уверенного владения современными методами анализа белков, а также способности непротиворечиво интерпретировать полученные экспериментальные данные.

Сравнительный анализ экспериментальных данных о вторичной структуре *TaATG8g*, полученных при помощи ИК-спектроскопии, и результатов, предсказанных при помощи I-TASSER, выглядит весьма убедительно. А в целом, экспериментальные данные по вторичной структуре белка согласуются с предсказанными.

Компьютерное моделирование трёхмерной структуры *TaATG8g* позволило В.В. Рябовол идентифицировать в этом белке аминокислотные мотивы, играющие определяющую роль во взаимодействии ATG8 с различными белковыми субстратами. На основании этих данных можно заключить, что *TaATG8g* обладает характеристиками, необходимыми для его вовлечения в биогенез аутофагосомальных мембран. Это, безусловно, приоритетные данные. К сказанному следует добавить, что теперь, используя полученные в работе В.В. Рябовол данные, можно предпринять направленный поиск белков-рецепторов, которые непосредственно взаимодействуют как с белками семейства ATG8, так и с их специфическими мишенями.

К экспериментальной части работы имеется несколько вопросов и замечаний:

- некоторые рисунки (рис. 8, 13, 28, 29, 31 диссертации) нуждаются в более подробных подписях, чтобы их можно было «читать», не обращая к тексту диссертации.
- на рис. 31 было бы желательно дать электрофореграммы фракций с другими временами удержания.
- каков выход рекомбинантного белка *TaATG8g*?
- какому количеству циклов при проведении ПЦР в реальном времени соответствуют данные, представленные в диссертации на рис. 10Б, 15 и рис. 5 автореферата?

Итоги экспериментальной части диссертационной работы подведены в **Заключении** (3 страницы), где суммированы полученные в работе данные, указывающие на важную роль аутофагии в ответе на стресс.

Завершают диссертацию семь **выводов**, в которых отражена теоретическая значимость исследования. Выводы сформулированы кратко, конкретно и ясно; они вполне согласуются с задачами, стоявшими перед диссертантом, и основаны на результатах большого числа проведённых экспериментов.

Прежде чем перейти к итоговой оценке работы В.В. Рябовол, необходимо отметить, что обзор литературы и описание результатов исследования сопровождаются наглядными схемами и превосходными фотографиями, что позволяет по заслугам оценить качество работы. Чётко оформлены подписи к рисункам (за небольшим исключением) и таблицы. В рукописи практически отсутствуют опечатки. Из несущественных огрехов можно упомянуть отсутствующее описание контроля очистки РНК от ДНК для ОТ-ПЦР, стилистические погрешности, ставший уже привычным лабораторный жаргон и ненужные кальки с английского при описании экспериментальных протоколов.

Оценивая диссертацию В.В. Рябовол в целом, надо подчеркнуть, что это оригинальное законченное научно-квалификационное исследование, в котором получены приоритетные данные о молекулярных основах аутофагии у растений. Поставленная диссертантом цель, несомненно, актуальна, а полученные результаты обладают высокой степенью научной новизны. Работа выполнена на высоком методическом и теоретическом уровне, достоверность результатов не вызывает сомнения, а выводы автора полностью соответствуют результатам, полученным в ходе экспериментов. Результаты работы в достаточной степени представлены в автореферате. Основные результаты диссертационного исследования, полученные лично соискателем, опубликованы в трёх статьях в престижных отечественных и международных журналах, включая издания, рекомендованные ВАК РФ, а также доложены на многих научных конференциях в нашей стране и за рубежом.

Новые сведения, полученные в работе В.В. Рябовол, могут быть использованы в биологических, сельскохозяйственных, биотехнологических научных институтах, а также в университетских программах подготовки студентов и аспирантов по молекулярной биологии, физиологии и биохимии растений, фитопатологии и цитологии.

Таким образом, диссертационная работа В.В. Рябовол «Характеристика морфологических, биохимических и молекулярных признаков аутофагии в корнях *Triticum aestivum* при стрессе» по теоретическому уровню, объёму проведённых исследований, научной новизне и практической значимости отвечает критериям, сформулированным в Разделе II «Положения о порядке присуждения учёных степеней», а автор работы, Виктория Вадимовна Рябовол, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Диссертация и отзыв обсуждены на совместном заседании лабораторий молекулярных основ внутриклеточной регуляции и мембран растительных клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук 5 августа 2014 года.

Доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярных основ
внутриклеточной регуляции
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки
Института физиологии растений
им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук

Г.В. Новикова



Новикова Г.В.
Тимирязева Е.Г.
17 августа 2014

С отзывом ознакомлена *[подпись]* 5.09.2014