

Отзыв официального оппонента к.б.н. Тютеревой Е.В.
на диссертацию Ветошкиной Дарьи Васильевны
«Роль пероксида водорода в адаптации фотосинтетического аппарата к условиям
освещения» на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 – биохимия,
представленную к защите 25 ноября 2016 г. в диссертационном совете Д 002.066.01 на
базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт
фундаментальных проблем биологии Российской академии наук
по адресу 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, д. 2.

Диссертация посвящена изучению сигнальной роли одной из активных форм кислорода – перекиси водорода – в механизмах кратковременной и долговременной адаптации состава и функционирования светособирающих комплексов тилакоидной мембраны как основы адаптации растений к изменяющимся условиям освещения.

Свет является основным эколого-физиологическим фактором, определяющим распространение растений, а также характеристики их фотосинтеза и продукционного процесса. В основе адаптации растений к изменениям световых условий произрастания лежит способность фотосинтетического аппарата растений к кратковременным и долговременным перестройкам в первую очередь на уровне состава пигмент-белковых комплексов тилакоидных мембран и гранальной системы хлоропластов, а также на уровне клеточной и мезоструктуры листа, размера, ориентации, числа листьев и т. д.

Пул пластохинона является одним из ключевых звеньев переноса электронов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи и играет важную роль в запуске механизмов кратковременной и долговременной адаптации. Одним из результатов перевосстановления пула пластохинонов является пероксид водорода, образующийся внутри тилакоидной мембраны. Диссертация посвящена исследованию сразу нескольких вышеперечисленных процессов и их причинно-следственной связи, а именно взаимосвязи между образованием пероксида водорода, окислительно-восстановительным состоянием пула пластохинонов, кратковременных адаптаций *state transition* и запуска долговременной адаптации при изменении световых условий произрастания растений.

Таким образом, данное исследование обладает **высокой актуальностью** и лежит в русле современной проблематики адаптивного функционирования фотосинтетического аппарата высших растений в изменяющихся условиях среды.

Целью работы являлось исследование роли пероксида водорода в адаптации растений к условиям освещения, осуществляемой посредством изменений в функционировании светособирающих комплексов, таких как: 1) механизм кратковременной адаптации «*state transitions*», который заключается в миграции части светособирающей антенны фотосистемы 2 между фотосистемой 2 и фотосистемой 1, и 2) механизм долговременной адаптации, при которой происходит уменьшение размера антенны фотосистемы 2 за счет подавления биосинтеза периферических белков антенны. В работе были поставлены и решались следующие задачи: 1) Установить, происходит ли образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны при скоростях электронного транспорта, близких к физиологическим; 2) Определить роль пероксида водорода в уменьшении размера антенны ФС2 при адаптации к долговременной

повышенной освещенности; 3) Определить, существует ли корреляция между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием процесса state transitions.

Научная новизна проведенного исследования несомненна. В работе впервые показаны многие чрезвычайно важные аспекты сигнальной роли пероксида водорода в адаптации функционирования фотосинтетической электрон-транспортной цепи при изменении интенсивности освещения. Из них следует особенно отметить следующие: 1) Показано, что образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны происходит при скоростях электронного транспорта, близких к физиологическим, и является результатом протекания реакции между пластогидрохиноном и супероксидным радикалом; 2) Показано, что пероксид водорода выполняет сигнальную роль в ходе долговременной адаптации к повышенной освещенности; происходящее при этой адаптации уменьшение размера антенны фотосистемы 2 происходит за счет уменьшения уровня экспрессии генов, кодирующих белки светособирающей антенны фотосистемы 2; 3) Выявлены различия в регуляции протекания перехода состояний 1-2 в двух видах растений при изменении интенсивности действующего света; 4) Показано, что увеличение количества пероксида водорода в листьях коррелирует с отсутствием перехода из состояния 2 в состояние 1.

Диссертационная работа отличается **высокой теоретической значимостью** полученных данных об участии пероксида водорода в регуляции размера антенны фотосистемы 2 и бесценна разработанными методологическими подходами к изучению роли пероксида водорода в качестве сигнальной молекулы и его ролью в хлоропластном сигналинге, направленном на регуляцию уровня экспрессии ядерных генов. Созданы действительно уникальные методические подходы, позволяющие оценить протекание state transitions на целых растениях с помощью измерений кинетики релаксации нефотохимического тушения после освещения, а также экспериментальный подход, позволяющий повышать и снижать количество пероксида водорода в листьях, что может быть в дальнейшем использовано при исследовании роли пероксида водорода в различных процессах. Результаты проведенных исследований могут быть использованы при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии растений, а также общей биологии. Таким образом, выполненная работа обладает **высокой практической значимостью**.

Диссертационная работа построена по традиционному плану и включает список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 303 источника (из них 293 на английском языке). Диссертация изложена на 127 страницах, иллюстрирована 46 рисунками и 6 таблицами.

Во введении лаконично очерчен круг исследуемых процессов и явлений, а также ясно показана актуальность проведения исследований в данной области.

В Главе 1 (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) представлены современные данные о важнейших компонентах фотосинтетической тилакоидной мембраны и функционировании электрон-транспортной цепи хлоропластов в контексте их реорганизации при кратковременных и долговременных адаптациях к изменению интенсивности света. Обзор прекрасно проиллюстрирован схемами и таблицами, высокоинформативен и логично изложен. Диссертант демонстрирует отличное знание проблематики в области исследования, акцентирует внимание на деталях, важных для понимания постановки цели и задач работы. Четко выдержан общий принцип изложения материала, состоящий в переходе от общих представлений о фотосинтезе, адаптации

растений к экологическим факторам среды к более узким вопросам адаптивных изменений работы электрон-транспортной цепи, являющихся предметами данного исследования, а именно, регуляторной роли пула пластохинонов, сигнальной роли активных форм кислорода, участия STN7 киназы в переходах состояний 1-2. Общее положительное впечатление от ознакомления с обзором оказывается немного омрачено ощущением излишней лаконичности информации относительно функций STN7 киназы и эффектов мутации по гену, кодирующему данный фермент.

В Главе 2 (МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ) приведена информация об объектах исследования и описание широкого спектра физиологических, биохимических и молекулярно-биологических методов, использовавшихся в работе. Следует отметить потрясающее методическое разнообразие подходов и современность методов, освоенных автором для достижения поставленных задач. В то же время, к существенным недостаткам этой главы относится отсутствие указания точного названия мутанта арабидопсиса по STN7 киназе (*stn7* нокаутная линия *Arabidopsis thaliana* из коллекции Salk collection), метода его получения (инсерционный мутагенез) и источника семенного материала (приведено только имя человека, любезно предоставившего семена). Другая недоработка автора диссертации состоит в недостаточной полноте описания используемых методик. В разделе 10 (10. Денатурирующий электрофорез) следовало бы привести полный состав 12-18% полиакриламидных гелей и описать способ получения градиента. В разделе 15 (15. Вестерн-блот анализ), во-первых, не раскрыт метод разделения тилакоидов, а лишь приведена ссылка на публикацию автора метода (Ballottari et al., 2004), во-вторых, полностью отсутствует описание использованных в работе антител с указанием фирмы-производителя или источника их получения. Кроме того, для большинства химических реагентов не указана степень химической чистоты и фирма-производитель. В описании методики оценки количественной ПЦР (9. Оценка уровня экспрессии генов, кодирующих Lhcb белки) не указан математический метод, использованный для расчета относительной экспрессии исследуемых генов. Упущено описание двух наиважнейших методических приемов, а именно, 1) описание ксантин/ксантиноксидазной системы, которую использовал автор для доказательства того, что пероксид водорода в тилакоидной мембране образуется в результате реакции между пластогидрохиноном и супероксидрадикалом (Раздел 3.2 Главы 3.); 2) описание методики использования фермента каталазы в качестве приема эффективного снижения H_2O_2 в клеточных органеллах на высоком свете, который автор использовал в большом количестве экспериментов, описанных в подразделах Раздела 3.4. Главы 3.

Экспериментальная часть работы (Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ) состоит из пяти разделов. В *первом разделе*, посвященном образованию пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны, автором детально описаны все этапы тщательного подбора условий, позволяющих на препаратах выделенных тилакоидов получать скорости транспорта электронов относительно близкие к физиологическим (в частности, подбор эффективного акцептора электронов от ФС1 - метилвиологена), предотвращать образование пероксида водорода в водной фазе тилакоидной суспензии (путем использования сверхнасыщающей концентрации цитохрома c, улавливающей все супероксидные радикалы, образованные вне тилакоидной мембраны, 60 мкМ), достоверно показано образование пероксида водорода внутри мембраны (с помощью каталазы) и проведена оценка доли его образования (30% от суммарного выделения препаратом тилакоидных мембран) на высоком свете (180 мкмоль квантов/м²с) в присутствии

терминального акцептора электронов MV, описаны три пути образования пероксида водорода в условиях переноса электронов по ЭТЦ и показана роль MV и цитохрома с в создании условий преимущественного протекания процесса образования пероксида в пределах тилакоидной мембраны. Формулируется гипотеза о сигнальной роли пероксида водорода, образованного с участием восстановленного пула пластохинона внутри тилакоидной мембраны, в запуске state transitions и адаптивном уменьшении размера антенны ФС2. *Второй раздел* начинается с описания системы (п.3.1.), подобранной в качестве теста возможности образования пероксида водорода при взаимодействии пластогидрохинона и супероксидрадикалов, которая далее успешно используется и убедительно демонстрирует образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны. Однако следует отметить некоторые моменты, затрудняющие понимание излагаемого материала, связанные с отсутствием описания принципа действия ксантин/ксантиноксидазной системы, которую следовало бы привести в главе 2 Материалы и методы. Так, в Таблице 2 (Таблица 2, стр. 59) в столбце добавок к свежеработанным тилакоидам фигурирует либо ксантин («+ксантин»), либо ксантиноксидаза («+ксантиноксидаза»), что не совсем понятно, поскольку для генерации супероксидного радикала необходим и субстрат ксантин, и фермент ксантиноксидаза.

В п.3.3.3. проанализирован ход 5-ти дневной адаптации растений арабидопсис к условиям высокой интенсивности света (при переносе от 70 до 360 мкмоль квантов/м²с). Показаны эффекты временного падения эффективного квантового выхода ФС2 (с конечной стабилизацией на более высоком уровне), сопровождающееся повышением уровня восстановленности уровня ПХ и НФТ и итоговым 15% падением в содержании белков Lhcb1 + Lhcb2, Lhcb6. Не вызывает сомнения, что при выбранных условиях изменения освещенности действительно происходит уменьшение размера антенны ФС2. Однако, остается неясным, каким образом была проведена идентификация полос на SDS геле (в том случае, если использовался вестерн-блоттинг, следовало бы привести результаты иммунодетекции) и, к сожалению, не приведены значения плотности анализируемых белковых полос по итогам проведения денситометрии.

В п.3.3.4 убедительно показана высокая вероятность регуляции размера антенны при выбранных условиях и объектах на уровне транскрипции (по уровню экспрессии трех генов, кодирующих антенные белки Lhcb2.2, Lhcb3 и Lhcb6) или на пост-транскрипционном этапе, а не на стадии трансляции, как предполагалось ранее.

Следующий подраздел диссертации посвящен определению сигнала для регуляции размера светособирающей антенны ФС2 при долговременной адаптации. Автор разработал и использовал в работе два **оригинальных** контрастных независимых подхода, позволяющих снижать количество пероксида водорода в листьях ячменя на фоне высокой освещенности (на фоне высокого уровня восстановления ПХ-пула) или увеличивать на фоне низкой освещенности (при низком уровне восстановленности ПХ-пула). *Снижение количества пероксида водорода в листьях* достигалось путем загрузки каталазы в апопласт через черешок в составе раствора для инкубации (раздел 3.4.1.1.). Утверждение об эффективности оттока перекиси водорода под действием каталазы подтверждается значительным снижением количества H₂O₂ в тотальных экстрактах из листьев на высоком свете (1000 мкмоль квантов/м²с) по сравнению с листьями на низком свете (100 мкмоль квантов/м²с) (Рисунок 22). Однако, при таком дизайне эксперимента, вероятно, следовало бы ввести дополнительный контроль (без каталазы) и попытаться измерить продукцию пероксида водорода не только в тотальном экстракте, но и в

апопластной фракции экстракта. Тем самым можно было бы подтвердить, что эффект каталазной добавки на свету объясняется именно оттоком пероксида водорода из органелл, а не снижением продукции перекиси в пределах апопласта.

Автором показано, что каталаза не влияет на уровень восстановленности пластохинона, но ее добавка препятствует снижению размера антенны (отношение $X_l a/X_l b$ и содержания белков Lhcb1, Lhcb2, Lhcb 3 и Lhcb6 не изменялись) на высоком свету. Т.о. автору удалось создать экспериментальные условия и снизить количество пероксида водорода в листьях при инкубации при высокой интенсивности света (Рисунок 22) на фоне высокого уровня восстановления ПХ-пула. Следует только отметить, что на Рисунке 26 Б столбцы с данными, маркированные звездочками достоверности различий, (*), не сопровождаются пояснениями о том, согласно какому статистическому критерию, при каком уровне значимости и по каким парам сравнения эта достоверность показана.

Увеличение количества пероксида водорода в листьях достигалось инкубацией листьев в присутствии экзогенного пероксида водорода (50 мМ или 100 мМ). Убедительно показано отсутствие негативного влияния пероксида водорода в выбранной концентрации на фотохимические процессы в ФС2. Эффект имитации высокого света добавкой 100 мМ перекиси водорода показан по накоплению крахмала, высокому уровню восстановленности пластохинонов, увеличению отношения $X_l a/X_l b$ и содержания белков антенны (Lhcb1+Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6), в листьях ячменя, находящихся на низком свету (Рисунки 27-31 и Таблица 4). Кроме того, показано, что увеличение содержания пероксида водорода в листьях приводило к уменьшению содержания транскриптов генов *lhcb1*, *lhcb3* и *lhcb6*. К сожалению, снижение уровня экспрессии *lhcb2*, которое утверждается в тексте, не проиллюстрировано автором на соответствующем рисунке (Рисунок 31).

Следующий раздел 3.5. диссертации посвящен установлению связи между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием процесса state transitions. Автором была поставлена и решалась задача разработки подхода, позволяющего оценить протекание state transitions в целых листьях модельных растений (растения арабидопсиса дикого типа и мутантные растения с заблокированным синтезом киназы STN7, а также листья ячменя, инкубированные в присутствии и в отсутствие NaF, ингибитора фосфатаз) *in vivo* при комнатной температуре. Достоверно показаны параметры воздействия, при которых процесс перехода состояний 2-1 можно оценить по времени релаксации НФТ (связанной с возвращением антенны ФС2 из состояния 2 в состояние 1): относительно низкий уровень освещенности (60 мкмоль квантов/м²с для арабидопсиса и до 600 мкмоль квантов/м²с для растений ячменя) и продолжительность предосвещения не менее 20 мин. Однако, следует заметить, что метод регистрации соотношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 на свету (Рисунок 35) не подтверждает время, необходимое для протекания перехода состояний 2-1 (как утверждает автор), но демонстрирует другие, не менее ценные, данные о времени перехода из состояния 1 в состояние 2. Вполне возможно, что временные характеристики двух переходов (1-2 и 2-1) совпадают и действительно составляют 20 мин, но для такого заключения, вероятно, требуются дополнительные эксперименты. Одним из интересных фактов, показанным автором, является различие в критических, относительно высоких, интенсивностях света при которых переходы состояний прекращаются в листьях арабидопсиса и в листьях ячменя (от 300 мкмоль квантов/м²с и выше для арабидопсиса, свыше 600 мкмоль квантов/м²с для ячменя).

В разделе 3.5.2. описываются поставленные автором на основании полученных знаний об особенностях протекания переходов состояний эксперименты по переносу растений в условия пограничной освещенности, при которой state transitions еще может происходить, но при которой уже запускается долговременная адаптация растений дикого типа к высокой интенсивности света, связанная с уменьшением размера антенны ФС2. В диком типе помимо признаков протекания переходов состояний (увеличение количества фосфорилированного белка Lhcb1), коррелирующих с повышенным содержанием перекиси водорода эндогенного происхождения, показано также развитие долговременной адаптации. Регистрировалась потенциальная возможность протекания переходов состояний в двух точках после повышения интенсивности освещения (Рисунок 42) – выявлены отличия в ходе релаксации qN только в вариантах до переноса и на 5 сутки после переноса в условия повышенной освещенности (что может быть с моей точки зрения проинтерпретировано как наличие перехода состояний 2-1 в диком типе). К сожалению, на графиках Рисунка 42 не приведены ошибки среднего и отсутствует оценка достоверности отличий статистическим методом, что делает затруднительным понимание выводов автора относительно наличия или отсутствия перехода состояний в диком типе.

В «Заключении» автором достаточно подробно обсуждены полученные данные и предложена схема участия пероксида водорода в адаптации фотосинтетического аппарата к изменению условий освещения. Схема позволяет рассмотреть два альтернативных сценария развития сигнального каскада с участием пероксида водорода в зависимости от интенсивности действующего света и является прекрасным обобщением полученных в работе результатов.

Блестяще выполненная работа не лишена некоторых недочетов в оформлении, таких как неполнота описания методов и недостаточно аккуратное оформление ссылок на литературу в списке литературы. Изложение и интерпретация некоторых данных не вполне ясны, в связи с чем хотелось бы уточнить у автора следующие моменты:

1. В чем состоят принцип метода генерации супероксидного радикала с помощью ксантин/ксантинооксидазной системы, использованной в данной работе, и преимущества использования этого метода в проведенных экспериментах на выделенных тилакоидных мембранах хлоропластов?

2. Каковы аргументы в пользу высказанного автором утверждения, что измеренное в листьях после их инкубации с каталазой количество пероксида водорода отражает снижение его содержания именно в клетках мезофилла, а не только в апопласте?

3. Близкий ход релаксации НФТ (qN) в условиях низкой освещенности в диком типе и *stn7* мутанте, согласно разработанной автором системе мониторинга переходов состояний (раздел 3.5), свидетельствует об отсутствии state transitions. В связи с ранее отмеченным упущением автора в оформлении графиков Рисунка 42, прошу привести эти графики в скорректированном виде и прокомментировать наличие или отсутствие переходов состояний в диком типе в данном конкретном случае.

Подчеркну, что вышеизложенные допущенные неточности нисколько не умаляют ценность работы и заслуги её автора. Полученные результаты являются достоверными. Автор использовал адекватные поставленным задачам методы, грамотно осуществил проведение экспериментов и анализ полученных данных, выполнил эксперименты в достаточной для статистического анализа повторности. Выводы, сделанные на основании проведенной работы, обоснованы и не вызывают сомнений.

Заключение. Диссертация Ветошкиной Дарьи Васильевны представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Многие факты получены впервые и при этом обладают высокой степенью научной новизны. Т.о. автору удалось существенно усовершенствовать целый ряд методов и получить уникальные данные, что позволило привнести, на мой взгляд, существенный интеллектуальный вклад в отечественную школу по исследованию фотосинтеза Пущинского научного центра, знаменитую, в том числе по выдающимся работам лаборатории Института фундаментальных проблем биологии РАН, многие из которых принадлежат сотрудникам Лаборатории фотосинтетического электронного транспорта.

Выводы диссертации обоснованы. Содержание автореферата отражает содержание диссертации. В итоге, можно заключить, что работа соответствует требованиям "Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а её автор Ветошкина Дарья Васильевна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

03 ноября 2016 г.

Елена Владимировна Тютерева
Кандидат биологических наук,
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
ETutereva@binran.ru

/Е.В. Тютерева/

Подпись руки
ЗАВЕРЯЮ

Тютерева Е.В.
Чайка Н.С.
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук

