



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

№ 401/3-217.1-841
на № _____ от _____


«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель директора Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

академик А.И. Мирошников
«09» ноября 2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук о научно-практической ценности диссертации Ветошкиной Дарьи Васильевны «Роль пероксида водорода в адаптации фотосинтетического аппарата к условиям освещения», представленной к защите в диссертационный совет Д 002.066.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте фундаментальных проблем биологии Российской академии наук на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Актуальность исследований. Фотосинтетическая электрон-транспортная цепь хлоропластов – не только преобразователь световой энергии, но и чувствительный датчик изменений, происходящих в окружающей среде и в метаболизме растений. При этом окислительно-восстановительное состояние пула пластохинона управляет многими адаптационными реакциями в растениях, в частности, играет ключевую роль в оптимизации фотосинтетической активности, что осуществляется за счет изменений в функционировании светособирающих комплексов. Эти изменения как кратковременного характера, т.н. state transitions, заключающиеся в изменении распределения в тилакоидной мембране существующих светособирающих комплексов, так и долговременного, когда при длительном воздействии света измененной интенсивности увеличивается или уменьшается размер светособирающих комплексов. При этом вопрос о молекулярном носителе сигнала, об

окислительно-восстановительном состоянии пула пластохинона до сих пор остается открытым. Именно исследованию данного вопроса посвящена основная часть диссертационной работы Ветошкиной Д.В.. Актуальность данного исследования, ориентированного на поиск недостающего звена, вовлеченного в инициирование сигнальных путей, необходимых для полноценного протекания адаптационных процессов, очевидна.

Актуально, конечно, и изучение механизмов процессов, протекающих в фотосинтетическом аппарате растений в ответ на изменения условий освещения растений. Соответствующая часть работы Ветошкиной Д.В. посвящена определению этапа биосинтеза белков антенны фотосистемы 2, подавление которого происходит при уменьшении размера антенны при долговременной адаптации растений к повышенной освещенности. В диссертационной работе осуществлена разработка экспериментального подхода, позволяющего оценить протекание state transitions на целых листьях. Анализ современной литературы показывает, что данному вопросу в настоящее время уделяется большое внимание. Работы по изучению state transitions, а также по изучению механизмов долговременной адаптации растений, ведутся во многих ведущих мировых лабораториях в области фотосинтеза. Несомненно, работа Ветошкиной Д.В. представляется актуальным и перспективным научным исследованием.

Научная новизна исследований, результатов и выводов. В современной науке активные формы кислорода (АФК) рассматривают не только как деструктивные молекулы, но и как сигнальные молекулы, которые на начальных этапах стрессовых воздействий иницируют включение механизмов, необходимых для адаптации растений к стрессовым условиям. Это направление исследований роли АФК считается одним из наиболее важных в современной науке.

Ветошкина Д.В. в ходе выполнения диссертационной работы доказала, что именно пероксид водорода обеспечивает регуляторную связь между окислительно-восстановительным состоянием пула пластохинона и протеканием выше перечисленных адаптационных процессов. Это открытие является своего рода «прорывом» в науке, поскольку, как пишет сам диссертант, начиная с 1960-1970-х годов, ученые многих стран мира были вовлечены в изучение вопроса о том, каким образом пул пластохинона иницирует каскад сигнальных путей, необходимых для запуска адаптационных изменений.

В ходе выполнения диссертационной работы диссертантом были получены следующие основные результаты: 1) 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) пероксид водорода выполняет сигнальную роль в ходе долговременной адаптации к повышенной освещенности, а происходящее при этой адаптации уменьшение размера

антенны фотосистемы 2 происходит за счет уменьшения уровня экспрессии генов, кодирующих белки светособирающей антенны; 3) увеличение количества пероксида водорода в листьях приводит к ингибированию возвращения светособирающих белков (L-тример) от фотосистемы 1 к фотосистеме 2 в процессе *state transitions*.

Кроме того, следует подчеркнуть широту работы Ветошкиной Д.В., поскольку проведено не только изучение фундаментальных вопросов, но разработан и ряд методических подходов. Диссертантом был разработан экспериментальный подход, основанный на исследовании релаксации нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* после освещения, позволяющий выявить протекание процесса *state transitions* в листьях. Научная новизна данного этапа работы заключается в том, что получены экспериментальные результаты, которые могут быть важным аргументом в продолжающемся в современной литературе споре о возможности оценки *state transitions* с помощью нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a*.

Полученные в работе Ветошкиной Д.В. данные, свидетельствующие о том, что при увеличении интенсивности света до 600 мкмоль квантов/м²с в листьях арабидопсиса полностью перестает протекать *state transitions*, в то время как в листьях ячменя при этой интенсивности света *state transitions* происходит, также характеризуются научной новизной. Представленные результаты указывают на существование различных эволюционно возникших механизмов регулирования протекания *state transitions* у разных видов растений при изменении освещенности.

Характеристика диссертационной работы и степень обоснованности научных положений, методов и результатов.

Работа построена по традиционному плану. Состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка использованной литературы. Материал диссертации изложен на 127 страницах машинописного текста. Содержит 6 таблиц и 46 рисунков. Список литературы включает 303 источника.

В первой главе «Обзор литературы» Ветошкиной Д.В. изложены общие представления о фотосинтезе, и детально рассмотрено строение фотосинтетической электрон-транспортной цепи высших растений. Подробно описано строение реакционных центров фотосистемы 1 и фотосистемы 2, а также светособирающей антенны фотосистемы 2, что является необходимым для описания конкретных задач, возникавших в процессе изучения решавшейся в диссертации проблемы.

В обзоре детально описаны адаптационные изменения, происходящие в организации пигмент-белковых антенных комплексов фотосинтетического аппарата при кратковременном и долговременном изменении уровня освещенности растений. Представлены данные литературы о регуляторной роли окислительно-восстановительного состояния пула

пластохинона при адаптации растений к условиям освещения. Рассмотрены экспериментальные результаты и гипотезы о механизмах образования АФК в хлоропластах. Приводится анализ имеющейся в современной литературе информации об участии STN7 киназы и в механизмах кратковременной, и в долговременной адаптации растений к условиям освещения.

Во второй главе дается описание объектов и методов исследования. Объектами исследования были растения: 1) гороха посевного (*Pisum sativum*); 2) ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*); 3) арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) экотип Columbia и мутантные растения арабидопсиса с заблокированным синтезом STN7 киназы. Флуоресценция хлорофилла *a* была измерена, используя флуориметры PAM-101 и miniPAM. Относительный уровень восстановления ПХ-пула оценивали по формуле $1 - (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$. ОЛП-кинетики записывали с помощью флуориметра, описанного в работе Kreslavski et al., (2014). Для измерения использовали синий свет. Денатурирующий электрофорез проводили в 12-18% градиентном полиакриламидном геле, используя трис-трициновый буфер. Для оценки количества белков использовали вестерн-блот анализ. Оценку скорости поглощения/выделения кислорода суспензией тилакоидов проводили с помощью закрытого электрода Кларка. Восстановление цитохрома *c* в суспензии тилакоидов измеряли по увеличению поглощения при длине волны 550 нм по сравнению с 540 нм. Для измерения использовался двухволновой спектрофотометр Hitachi 557. Измерение количества пероксида водорода было основано на перекисном окислении люминола. Оценку уровня экспрессии генов, проводили с помощью количественной ОТ-ПЦР. Измерение спектров низкотемпературной флуоресценции проводили на целых листьях ячменя или арабидопсиса на спектрофлуориметре Hitachi 850 при длине волны возбуждения флуоресценции 435 нм.

Набор использованных методов свидетельствует не только о высокой квалификации диссертанта как исследователя, но и показывает, что методы подбирались для решения поставленных задач, что позволяло делать более обоснованные выводы без привлечения каких-либо предположений.

В третьей главе диссертации приводятся полученные результаты, сопровождающиеся их обсуждением. Раздел 3.1 посвящен изучению образования пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны. Эффективный искусственный акцептор электронов от фотосистемы 1, метилвиологен, был применен для обеспечения скорости электронного транспорта сопоставимой со скоростями в физиологических условиях. Определена насыщающая концентрация цитохрома *c*, при которой предотвращалась дисмутация супероксидных радикалов вне тилакоидов, использовавшаяся в дальнейшем для изучения образования пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны. Результаты показали, что при высокой интенсивности света, даже в присутствии метилвиологена, пероксид водорода образуется

внутри тилакоидной мембраны. В конце главы 3.1 описаны возможные пути образования пероксида водорода в присутствии и отсутствие метилвиологена.

Раздел 3.2 посвящен доказательству протекания реакции между пластогидрохиноном, ПХН₂, и супероксидным радикалом. Для доказательства протекания этой реакции была использована ксантин/ксантинооксидазная система, генерирующая супероксидный радикал. Было показано, что улучшение «посадки» компонентов ксантин/ксантинооксидазной системы на мембрану было существенным обстоятельством, позволившим получить свидетельства протекания реакции между пластогидрохиноном и супероксидным радикалом в мембране.

В разделе 3.3 автором показано, что уменьшение размера антенны фотосистемы 2 при долговременной адаптации к повышенной освещенности растений дикого типа *Arabidopsis thaliana* происходит скорее на уровне транскрипции, а не на уровне трансляции, как предполагалось ранее.

Раздел 3.4 является наиболее обширной частью диссертационной работы и содержит данные об определении сигнала, приводящего к уменьшению размера антенны фотосистемы 2 при долговременной адаптации к повышенной освещенности. С помощью двух независимых подходов, позволяющих регулировать количество пероксида водорода внутри листа, было убедительно показано, что сигналом для уменьшения размера антенны при долговременной адаптации к повышенной освещенности является пероксид водорода.

В разделе 3.5 представлены результаты, свидетельствующие о наличии связи между количеством пероксида водорода в листе и протеканием процесса state transitions. Первым необходимым этапом этой работы стал подбор методики для оценки протекания state transitions на целых листьях. Был разработан подход, основанный на измерении релаксации нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* при комнатной температуре и показано влияние продолжительности освещения и интенсивности действующего света на протекание state transitions в двух разных видах растений. На основании разработанного подхода было определено влияние повышения интенсивности света во время выращивания растений *A. thaliana* на потенциальную возможность протекания процесса state transitions в листьях. Выявление связи между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием state transitions в этих условиях показало, что увеличение количества пероксида водорода в листе коррелирует с отсутствием процесса state transitions в листьях.

В «Заключении» обобщаются полученные в работе результаты.

Завершают диссертацию шесть выводов, которые вполне согласуются с задачами, стоявшими перед диссертантом, и обоснованы результатами проведенных экспериментов.

По проведенной работе и по тексту диссертации можно сделать ряд замечаний. В частности, неполно описаны некоторые методики. В подписи к таб. 2 недостаточно информации для понимания таблицы, в частности не приведены значения концентраций

ксантина и ксантинооксидазы, а также не указано присутствовал ли в среде акцептор электронов при измерении. На рис. 36 и 40 использовано сглаживание хода кривых, что ухудшает восприятие данных. Графики и обозначения на осях, представленные в автореферате, плохо читаются из-за маленького размера.

Достоверность научных положений, полученных результатов и выводов.

Анализ представленного диссертантом материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных результатов. Полученные результаты обработаны статистически. Основные положения диссертационной работы полностью изложены в автореферате, и отражены в публикациях, а именно в 6 статьях в журналах, 4 из которых рекомендованы ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований. Результаты диссертации достаточно широко апробированы на всероссийских и международных конференциях.

Значимость полученных данных для науки и практики.

Для решения поставленной задачи, которая отражена в названии диссертации «Роль пероксида водорода в адаптации фотосинтетического аппарата к условиям освещения», Ветошкиной Д.В. были разработаны экспериментальные подходы, позволяющие регулировать количество пероксида водорода в листьях, что может быть в дальнейшем использовано при исследовании роли пероксида водорода в различных процессах.

Полученные в работе данные об участии пероксида водорода в регуляции размера антенны фотосистемы 2 расширяют знания о сигнальных путях в высших растениях и открывают перспективы для выяснения более детального механизма передачи сигнала от хлоропласта к ядру, необходимого для регуляции уровня экспрессии ядерных генов.

Кроме того, в ходе диссертационной работы был разработан методический подход, позволяющий оценить протекание state transitions на целых растениях с помощью измерений кинетики релаксации нефотохимического тушения после освещения. Разработка такого подхода имеет важное значение для науки.

Диссертационная работа Ветошкиной Дарьи Васильевны обсуждалась на расширенном научном семинаре группы иммунохимии филиала учреждения РАН института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (протокол № 10 от 02 ноября 2016 г.), получила положительную оценку и рекомендацию к защите.

Заключение.

Представленная работа является законченным научным трудом, который способен внести заметный вклад в расширение представлений о функционировании фотосинтетического аппарата растений.

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Выводы диссертации обоснованы и достоверны. В автореферате диссертации отражены все основные положения работы. Результаты исследований Дарьи Васильевны могут быть использованы в

лабораториях Филиала института биоорганической химии РАН, Биолого-почвенном институте ДВО РАН и других институтах исследующих процессы фотосинтеза в растениях.

Диссертация Ветошкиной Дарьи Васильевны на тему: «Роль пероксида водорода в адаптации фотосинтетического аппарата к условиям освещения» соответствует требованиям предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

д.б.н., рук. лаб. иммунохимии,

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Института биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Ф.А. Бровко

Подпись заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

д. ф.-м. н.



В.А. Олейников