

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА К.Б.Н. О.В. ВОЙЦЕХОВСКОЙ
на диссертационную работу Журиковой Елены Михайловны «Исследование участия
альфа-карбоангидразы 2 и альфа-карбоангидразы 4 в фотосинтетическом метаболизме
Arabidopsis thaliana» 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.
Пушино Московской обл., ул. Институтская, д. 2.

Суперсемейство карбоангидраз представляет собой одну из важнейших групп белков в любой живой клетке. Карбоангидразная активность является необходимым компонентом клеточного рН-стата, и таким образом от нее зависит работа большинства клеточных энзиматических машин. Физиологические роли карбоангидраз многообразны, и это отражено в существовании у живых организмов большого числа семейств карбоангидраз, каждое из которых включает несколько изоформ. Исследования карбоангидраз млекопитающих связаны с ролью, которые эти ферменты выполняют в таких ключевых процессах, как дыхание, реабсорбция в почечных канальцах и продукция соляной кислоты в желудке. У растений к настоящему времени также выявлен ряд изоформ карбоангидраз, но функции большинства из них в организме растений пока что остаются неизученными. Поэтому тема диссертационной работы Елены Михайловны Журиковой весьма **актуальна**. Выполненное ею исследование было призвано восполнить недостаток знаний о физиологических ролях различных изоформ карбоангидраз в растительной клетке. Автор справилась с поставленной сложной задачей.

Для достижения поставленной цели автором был использован ряд современных методов физиологии, биохимии, молекулярной биологии и цитологии. Диссертационная работа отличается **высокой теоретической значимостью**, оригинальностью и **новизной**, поскольку абсолютное большинство данных получено автором впервые. Результаты проведенных исследований могут быть использованы при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии растений, биохимии и общей биологии. Кроме того, выявленные в данной работе новые механизмы регуляции процесса фотосинтеза в будущем могут открыть новые возможности управления продукционным процессом растений. Таким образом, выполненная работа обладает и **высокой практической значимостью**.

Диссертация состоит из Введения, четырех глав – «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты» и «Обсуждение» - а также Выводов и Списка литературы из 216 наименований. Объем диссертации 131 страница, 32 рисунка и 17 таблиц. Во Введении автором подчеркивается наличие большого числа изоформ карбоангидраз в клетке растений, и отсутствие литературных данных по большинству из них, и обосновывается выбор карбоангидраз α КА2 и α КА4 в качестве объектов исследования в рамках диссертационной работы. В то время как относительно

карбоангидразы α КА4 в литературе имелись некоторые обрывочные сведения относительно ее возможной локализации в клетках высших растений, но не о функциях этого фермента, изучение карбоангидразы α КА2 предпринято впервые. Автор делает смелое, но достаточно обоснованное заключение о том, что в настоящее время нельзя считать доказанной роль карбоангидраз в процессе фотосинтеза у наземных растений, и формулирует **цель** диссертационной работы как выявление участия карбоангидраз α КА2 и α КА4 в фотосинтезе и определение их места в этом процессе. Во Введении также логично обосновываются задачи (3 задачи), решение которых позволяет достичь поставленную диссертантом цель исследования.

Здесь хотелось бы сделать уточнение, которое не касается цели работы и поставленных задач. А именно, уточнения требует высказанное замечание автора, что отсутствие снижения фотосинтеза при снижении содержания мажорного белка хлоропластов β КА1 до 1 %, показанное в работе Price et al. (1994), может свидетельствовать о том, что количество белка не равно его функциональной важности. Напротив, многолетние исследования метаболической регуляции убедительно показали, что большой запас фермента в клетке и низкий коэффициент контроля C (dJ/J ; dE/E) для данного фермента E и процесса J в оптимальных условиях (Stitt, Sonnewald, 1995) являются характеристикой именно ключевых регуляторных ферментов, играющих определяющую роль для данного процесса. В пример можно привести Рубиско, фермент с высоким содержанием и низким коэффициентом контроля: снижение количества белка Рубиско до минимума у трансгенных растений не оказывало существенного влияния на фотосинтез в большинстве протестированных условий выращивания. Таким образом, работа Price et al. (1994) должна рассматриваться скорее как свидетельство в пользу крайней важности β КА1 для процесса фотосинтеза. Кроме того, остается не вполне понятным сделанное во Введении утверждение автора о том, что обнаруженная в работе способность растений-мутантов по гену α КА4 накапливать значительное количество крахмала имеет важное практическое значение, поскольку в работе установлено лишь накопление транзитного крахмала в листьях, а содержание крахмала в запасующих органах не исследовалось. Хорошо известно, что уровень транзитного крахмала в листьях демонстрирует четкую суточную динамику и никак не связан с накоплением крахмала в имеющих хозяйственное значение запасующих органах растений.

Обзор литературы включает 42 страницы, он логично построен и разбит на пять разделов. В первой части обзора автор демонстрирует широкий кругозор и прекрасные знания о состоянии современных исследований карбоангидраз у растений, и вводит читателя в круг имеющихся нерешенных проблем. Можно было бы только пожелать, чтобы автор коснулась и вопроса о том, как именно мембраносвязанные карбоангидразы крепятся к мембране. Возможно ли участие гликозил-фосфатидилинозитола в механизме крепления карбоангидраз к плазмалемме, имеются ли у некоторых карбоангидраз трансмембранные домены? Эта информация способствовала бы лучшему пониманию той части исследования, которая связана с выявлением субклеточной локализации карбоангидраз. Также хотелось бы, чтобы автор упомянула о том, насколько высоко (или наоборот, низко) в количественном отношении содержание изучаемых в диссертации карбоангидраз в клетке по сравнению

с карбоангидразами других изоформ и семейств, на уровне содержания белка или экспрессии соответствующих им генов.

Вторая часть обзора посвящена анализу современных знаний о структурно-функциональной организации фотосинтетической электрон-транспортной цепи и методах ее изучения. Она также написана компетентно и полно. Можно отметить лишь некоторые неточности, например, при обсуждении роли зеаксантина в фотосинтезе за рамками обзора осталась ключевая функция этого пигмента в фотозащите, которая состоит в формировании ион-радикальных пар с молекулами хлорофилла, представляющих собой центры диссипации избыточной световой энергии (Ahn et al 2008; Avenson et al. 2008). В разделе, где обсуждается индукция флуоресценции хлорофилла, практически не рассматривается кинетика быстрой фазы ОЛР, хотя такой разбор был бы логичным в связи с тем, что часть заключений в диссертации сделана на основе полученных данных по кинетике ОЛР.

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. Следует отметить, что описание мутантных линий, используемых в работе, выполнено безупречно точно, и крайне важен тот факт, что автор не остановился на изучении лишь одной независимой линии для каждой мутации, но включил в анализ две независимые линии для каждого мутанта. Однако, в некоторых случаях приведенные в диссертации описания методов и рабочих протоколов слишком кратки. Так, хотя в целом описание использованных методов выполнено подробно и тщательно, для методики ультраструктурных исследований с помощью ТЭМ следовало бы привести полностью применяемый протокол, а не ссылаться на опубликованную работу. Интересно было бы узнать, чем вызван выбор концентрации CO_2 700 ppm при измерении скоростей ассимиляции CO_2 . Не указано, с помощью какого прибора изучали кинетику флуоресценции фазы ОЛР. Далее, в описании методов автор нигде не указывает, каким образом была проведена статистическая обработка результатов. В некоторых случаях на рисунках и в таблицах значения отмечены звездочкой, а в легенде указано, что $P \leq 0,05$, но нигде в работе не указано, какой критерий применялся для оценки достоверности различий. Во множестве случаев, однако, информация о статистической оценке достоверности постулируемых в работе отличий отсутствует: это касается ряда рисунков и таблиц раздела «Результаты». При этом не приводятся и оригинальные данные, на основе которых читатель при необходимости мог бы сам оценить статистическую достоверность различий между усредненными значениями в сравниваемых вариантах. Хотелось бы пожелать автору обратить серьезное внимание на то, что даже самые очевидные «на глаз» различия не являются доказанными, если не были применены адекватные статистические методы оценки значимости этих различий.

Глава «Результаты» состоит из восьми разделов. Результаты, полученные диссертантом, полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Большинство из них получено впервые для растительных организмов.

Первая часть результатов (раздел 3.1) очень важна для всей работы, так как от нее зависит в значительной мере интерпретация других полученных данных. Большое интерес и высокую научную ценность представляют результаты, демонстрирующие регуляцию экспрессии генов, кодирующих исследуемые карбоангидразы, такими факторами как уровень освещенности и содержание CO_2 в воздухе. Увеличение уровня экспрессии генов обоих ферментов при повышении освещенности растений и зависимость этого уровня от концентрации CO_2 являются сильным аргументом в пользу функционирования этих ферментов в процессе фотосинтеза у высших растений. В разделе 3.2 проанализировано влияние изучаемых мутаций на внешний вид растений и на такой интегральный показатель фотосинтеза и продукционного процесса, как вес растений, а в разделе 3.3. анализируется суточная динамика содержания крахмала в листьях исследуемых линий. Представленные количественные данные красиво и наглядно проиллюстрированы микрофотографиями крахмальных зерен в хлоропластах изучаемых объектов (Рисунок 17). Большой интерес представляет впервые установленное автором влияние мутаций в генах, кодирующих изоформы αKA2 и αKA4 , на уровень фотосинтетической фиксации CO_2 (раздел 3.4).

В целом представленные в этих разделах диссертации результаты не оставляют сомнений в справедливости заключений, сделанных автором на их основе. Они обозначают интереснейшее направление для дальнейших исследований, и работа в этом направлении позволит установить роль карбоангидраз в продукционном процессе растений.

Большая часть полученных автором данных представлена в разделах 3.5 – 3.8, и она касается исследования характеристик фотосинтеза с помощью измерений параметров флуоресценции хлорофилла *a*. Для этого автор использовала методы ПАМ-флуориметрии в условиях низкой ($100 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$) либо высокой ($500 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$) интенсивности света и при поддержании CO_2 в воздухе листовой камеры-прищепки в концентрации 100, 800 и 1500 ppm во время проведения измерений. Кроме того, с помощью флуориметрии DUAL-ПАМ напрямую оценивались параметры функционирования ФС1. Обнаружено, что различия между мутантами и диким типом проявляются на высоком свете при высоком содержании в воздухе диоксида углерода и состоят в изменении квантового выхода ФС2 (у мутанта αKA4 он больше, а у мутанта αKA4 – меньше, чем у дикого типа) и в изменении НФХТ за счет сдвигов в компоненте qE , зависящей от подкисления люмена тилакоидов (у мутанта αKA4 он снижен, а у мутанта αKA4 – увеличен по сравнению с диким типом).

К разделам 3.5.3 и 3.5.4 можно высказать несколько замечаний. Автор обнаружила, что емкость пула электронных акцепторов до полного восстановления пула пластохинона (определенная по кинетике фазы OJIP, Таблица 12), у мутанта по αKA2 ниже, чем у дикого типа, а у мутанта по αKA4 - выше. В то же время, для данных, приведенных в Таблице 12, не вычислена стандартная ошибка. Означает ли это, что измерения были проведены в однократной повторности? Кроме того, значения относительного уровня восстановленности для дикого типа, приведенные в Таблицах 10 и 11, сильно различаются. Хотелось бы знать, чем объясняются эти различия с точки зрения автора.

Автор убедительно связывает различия в степени восстановленности пула пластохинонов со скоростью его окисления на акцепторах ФС1 и скоростью фотосинтетической CO_2 . На основании проведенных наблюдений делается предположение о перераспределении потоков электронов у мутантов между основным потоком в сторону НАДФ⁺ и альтернативным потоком к O_2 . Для проверки этого предположения были проведены измерения содержания пероксида водорода в листьях изучаемых растений. Результаты подтвердили выдвинутую гипотезу: в линиях мутанта по гену, кодирующему αKA4 , уровень пероксида водорода был выше, а в линиях мутанта по αKA2 – ниже, чем у дикого типа. Эти данные представлены на Рисунках 30 и 31, но не проанализирована статистическая достоверность явно имеющих различий.

С использованием стимулятора карбоангидраз альфа-семейства, ацетазоламида, автор выполнил ряд трудоемких, но остроумных экспериментов, которые позволили впервые выдвинуть предположение о местах внутрихлоропластной локализации изучаемых изоформ карбоангидраз. Эти данные представлены в разделе 3.8. Обращает на себя внимание, что в Таблицах 14-16 средние значения представлены с очень большими разбросами. Учитывая высокую важность этого раздела диссертации для сделанных автором выводов, а также новизну и ценность полученной информации для научного сообщества, здесь особенно необходимо применить статистические методы к полученным данным.

Глава «Обсуждение результатов» суммирует и обобщает полученное автором разнообразие данных. Теперь отчетливо видно, что исследованные карбоангидразы выполняют во многом «противоположные» роли, и можно полностью согласиться с автором, что ей удалось впервые установить участие αKA2 и αKA4 в метаболизме высших растений и определить процесс, в котором они принимают участие, а именно в регуляции диссипации энергии света, поглощаемой пигментами фотосинтетического аппарата. На Рисунке 32 приведена схема, иллюстрирующая внутриклеточную локализацию обеих карбоангидраз и их роли в хлоропластах арабидопсиса, установленные на основании глубокого осмысления автором полученных результатов. Возможно, автору удастся в дальнейшем подтвердить высказанную гипотезу с помощью специфичных антител и трансмиссионной электронной микроскопии.

Наиболее существенными для интерпретации полученных автором результатов считаю следующие вопросы.

(1) Как правило, в работе данные по каждому мутанту - αKA2 и αKA4 – приводятся отдельно, и каждому мутанту соответствует контроль (дикий тип). Выбранная схема эксперимента является единственно верной, поскольку позволяет минимизировать различия между диким типом и мутантом, обусловленные условиями выращивания. В то же время, для самих растений дикого типа, выращенных в качестве контрольного варианта соответственно для мутантов αKA2 и αKA4 , наблюдались очень существенные различия в ряде измеренных показателей, иногда превышающие диапазон различий между мутантом и соответствующим вариантом дикого типа. Можно полагать, что это объясняется условиями выращивания растений. Если это так, то с какими факторами (полив, затенение, возраст растений) в первую очередь связаны наблюдаемые существенные различия? В каком диапазоне (для каждого типа экспериментов) лежит аналогичная привнесенная условиями выращивания ошибка для

мутантных растений? Пример: на Рисунках 19 и 23 квантовый выход растений только дикого типа отличается в три раза – чем это объясняется, и если использовать выровненный материал, то сохранятся ли описываемые различия между мутантами и диким типом?

(2) Выявленные автором в ходе выполнения диссертационной работы различия в ряде параметров между растениями дикого типа и растениями-мутантами по генам α КА2 и α КА4 представляют высокую научную ценность и новизну, позволяют впервые сделать вывод о возможной субклеточной локализации и физиологической роли карбоангидраз α КА2 и α КА4 растений. В связи с этим, в дополнение к приведенным в работе сведениям, прошу автора оценить достоверность различий для выборок, средние которых представлены в Таблицах 14 и 15, а также на Рисунках 30 и 31, с использованием адекватного для каждого случая по мнению автора статистического критерия, привести полученные значения критерия и на их основании сделать вывод об уровне значимости установленных различий.

(3) Автор показала, что у мутантов по α КА2 сырой вес розетки листьев и содержание крахмала были несколько ниже, чем у растений дикого типа. При этом скорость ассимиляции CO_2 листом была значительно выше, чем у растений дикого типа. Возникает вопрос, где же находится сток для ассимилируемого диоксида углерода? Аналогичный вопрос возникает и для мутантов по α КА4, у которых сырой вес розетки листьев и содержание крахмала были выше, а скорость ассимиляции CO_2 листом была ниже, чем у дикого типа: что было источником дополнительной биомассы у этих растений?

Несмотря на высказанные в отзыве замечания, сделанные автором в работе выводы можно считать вполне обоснованными. Замечания ни в коей мере не умаляют значения диссертационной работы и не снижают произведенного общего впечатления от выполненного исследования. Хочу еще раз обратить внимание на высокий методический и теоретический уровень выполнения работы, и большую научную ценность полученных автором результатов. Они открывают перспективы для исследований сразу по нескольким направлениям.

Диссертация хорошо оформлена, можно сделать лишь несколько небольших замечаний. В тексте часто встречаются опечатки, касающиеся расстановки запятых. Надписи на рисунках 1-8, 10 и 11 не переведены на русский язык. На рисунке 17 не приведена масштабная линейка. Автореферат диссертации Журиковой Е.М. полностью отражает содержание диссертации (можно отметить лишь одну досадную неточность: в автореферате содержание таблиц 3 и 4 идентично, хотя эти таблицы должны отражать разные данные по влиянию ацетазоламида на карбоангидразную активность тилакоидов и ФС2-мембран, соответственно). Но все перечисленные неточности не влияют на изложение материала и сделанные автором выводы. Материалы диссертационной работы неоднократно докладывались на Всероссийских и международных конференциях. По теме диссертации автором опубликовано три научные статьи, две из них - в журналах, рекомендованных ВАК. Публикации 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 высокий 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 Журиковой Е.М. представляет собой завершённое, важное и интересное исследование. Написанная диссертация вполне соответствует требованиям "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а её автор - требованиям, предъявляемым к работам, представляемым к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03. 01. 04 - «Биохимия растений». Журикова Е.М. заслуживает присуждения этой степени.

03 ноября 2016 г.

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

/О.В.Войцеховская/

Подпись руки *Войцеховской О.В.*
ЗАВЕРЯЮ *Мирот. Нерсисян*
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук