ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА на диссертационную работу Ветошкиной Дарьи Васильевны на тему: «Роль пероксида водорода в адаптации фотосинтетического аппарата к условиям освещения», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности биохимия - 03.01.04

Жизнь на планете Земля поддерживается благодаря процессу фотосинтеза. Несмотря на то, что этот процесс происходит в клетках или органеллах, которые, как правило, размером всего в несколько микрон, процесс оказывает глубокое воздействие на атмосферу и биосферу. Первичные процессы фотосинтеза, а именно преобразование энергии света в электрохимический потенциал ионов водорода наряду с образованием молекулярного кислорода, молекулы АТФ и восстановленной формы НАДФ происходит в тилакоидах цианобактерий и хлоропластов. Тилакоидные мембраны являются местом локализации 4-х индивидуальных трансмембранных белковых комплексов (фотосистема 2, цитохромный b_6f, фотосистема 1 и АТФ-синтеза) и двух небольших, способных к диффузии переносчиков зарядов (пластоцианин и пул пластохинонов). При светоиндуцированном функционировании электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), случайное взаимодействие компонентов переноса электронов с O_2 может привести к одноэлектронному или двухэлектронному восстановлению O_2 до супероксида (Q^-) или пероксида водорода (H_2O_2), соответственно, являющимися предшественниками радикала гидроксила ($OH^{\bullet}$), сильнейшего окислителя, разрушающего любое вещество живой клетки, включая самое ценное – ДНК. Образование АФК, как выяснилось, тонко регулируемый организмом процесс. В связи с этим, исследование образования H_2O_2, являющейся кинетически самой стабильной формой АФК, при участии пула ПХ является крайне важной задачей, тем более что именно изменение редокс-состояния этого пула запускает кратковременную и долговременную адаптации растений к повышенной освещенности. Однако молекулярная природа сигнала, поступающего из пула ПХ и инициирующие эти адаптационные изменения, оставалось до сих пор невыясненной.

Целью диссертационной работы Ветошкиной Д.В. являлось исследование роли H_2O_2 в адаптации растений к условиям освещения, осуществляемой посредством изменений в функционировании светособирающих комплексов, таких как механизм кратковременной адаптации, *state transitions,* и механизм долговременной адаптации.

Научная новизна. В работе впервые было показано, что образование H_2O_2 внутри тилакоидной мембраны происходит при скоростях электронного транспорта близких к физиологическим. Представлена доказательства в пользу того, что H_2O_2 образуется в результате реакции пластогидрохинона с супероксидным радикалом и H_2O_2 является неотъемлемым звеном в инициировании сигнальных путей. Представлены различия в

регуляции протекания state transitions в двух видах растений при изменении интенсивности действующего света.

Практическая значимость. Полученные данные, несомненно, имеют практическое значение для понимания того, как растения приспосабливаются к изменениям в окружающей среде.

Диссертационная работа написана по классической схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирована 46 рисунками и 6 таблицами. Список литературы включает 303 наименования.

Во введении представлены актуальность проблемы и цели исследования, отражена научная новизна работы и ее практическая значимость. Обзор литературы состоит из семи частей, в которых изложены общие представления о фотосинтезе, строение фотосинтетической ЭТЦ, адаптации растений к изменениям условий освещения и регуляторная роль пула ПХ, образование и сигнальная роль АФК в хлоропластах высших растений и STN7 киназа. Последняя представляет собой трансмембранный белок, осуществляющий фосфорилирование белков LHCII.

Экспериментальная часть работы, описанная в главе 2, представляет собой добротный и яркий научный материал, полученный при использовании самых современных методов физико-химического анализа. В качестве объектов исследования были использованы интактные листья и тилакоидные мембраны, изолированные из листьев гороха, ячменя, а также Резухови́дки Та́ля (*Arabidópsis thaliána*). Автором была проведена оценка уровня экспрессии генов, кодирующих Lhcb белки с помощью ПЦР, а также Вестерн-блот и электрофоретический анализ для выявления изменений в количестве белков антенны ФС2. Что касается аналитических подходов, автором было проведено измерение 1) флуоресценции хлорофилла *a* листьев, 2) релаксации нефотохимического тушения флуоресценции после освещения в листьях, 3) индукции флуоресценции хлорофилла *a* в первую секунду освещения, 4) спектров низкотемпературной флуоресценции хлорофилла в целых листьях, 5) обмена кислорода в суспензии тилакоидов, 6) скорости восстановления добавленного растворимого цитохрома *c*, 7) ЭПР спектров при комнатной температуре, 8) количества пероксида водорода и 9) количества крахмала в листьях.

Результаты экспериментов и их обсуждение описаны в главе 3. Изначально автором подобраны условия, позволяющие получить скорости транспорта электронов относительно близкие к физиологическим, т.е. эксперименты проводились в присутствии эффективного искусственного акцептора электронов метилвиологена (МВ) при двух интенсивностях света, отличающихся более чем в 7 раз. Для оценки образования H_2O_2 в суспензии тилакоидов был использован насыщающая концентрация цитохрома *c* в качестве ловушки супероксидных радикалов. Показано, что добавление каталазы при низкой интенсивности света не влияет на скорость выделения кислорода, в то время как при высокой интенсивности света скорость выделения кислорода увеличивается в ~1,8 раз. Полученные результаты позволили автору заключить, что образование H_2O_2 происходит внутри тилакоидной мембраны в результате реакции между супероксидным радикалом и пластогидрохиноном. В пользу последнего утверждения наглядно свидетельствуют данные, полученные в тилакоидных мембранах с использованием ксантин-ксантиноксидазной системы в присутствии и в отсутствие БСА путем определения степени восстановленности пула ПХ. Показано, что степень восстановления пула уменьшается на ~18%. Важным результатом также являются данные по выявлению участия H_2O_2 в модуляции размера светособирающей антенны ФС2 при долговременной адаптации к повышенной интенсивности света. Показано, что уменьшение размера внешней антенны коррелирует с уменьшением транскрипции генов этих белков. К интересным результатам можно также отнести данные о том, что увеличение количества H_2O_2 при низкой интенсивности света приводит к уменьшению размера антенны ФС2. Одним из основных достижений в работе является разработка экспериментального подхода для оценки протекания *state transitions* на целых листьях. Если вкратце, то на основании сопоставления кинетики релаксации нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* в диком типе и мутантном растении (нокаутированной по гену *stn*7) *Arabidópsis thaliána*, а также в растениях ячменя, инкубированных в присутствии и в отсутствие NaF, выявлена часть релаксации этого тушения, которая отражает *state transitions*. Следует отметить, что несмотря на определенные успехи, механизм активации *stn*7 киназы до сих пор остается дискутируемым. Данные, полученные в представленной работе позволили автору предположить, что механизм участия H_2O_2 при *state transitions* заключается в регуляции активности *stn*7 киназы, приводящих к накоплению фосфорилированных белков Lhcb1 и блокированию светосибирающей антенны в связанном с ФС1 состоянии.

В Заключении резюмированы результаты этого большого и интересного исследования.

Отмечу, что все результаты работы являются оригинальными и научно обоснованными. Они были **опубликованы** в рецензируемых научных журналах и **апробированы** на отечественных и международных конференциях. Достоверность полученных результатов подтверждаются тщательностью постановки исследований, количественным анализом экспериментальных данных, а также их соответствием данным, известным из литературы.

Выводы диссертации логично вытекают из полученных результатов.

Замечания. Диссертационная работа Ветошкиной Д.В. содержит ряд недостатков. На стр.14. «….антенных белка CP43 и CP47, связывающих ….1 негемовое железо, один или более хлорид ион и один бикарбонат ион». Все эти перечисленные компоненты координируются с белками реакционного центра (D1/D2) ФС2, а не интегральными антеннами белками; на стр.16. «…скорость электронного переноса на этом участке составляет 20 нс до 35 мс в зависимости от редокс состояния компонентов водоокисляющего цикла». Полный оборот фермента с выделением побочного продукта кислорода завершается за время 1-2 мс. При этом перенос электрона между тирозином и фотоокисленным донором электрона P680 осуществляется за время 30-300 нс в зависимости от S-переходов комплекса окисления воды; было бы целесообразно дать значение как кинетических, так и термодинамических параметров всех критических компонентов переноса зарядов в ЭТЦ в тилакоидах; при описании функционирования цитохромного комплекса b_6f, необходимо было кроме Q-цикла также описать и другие возможные механизмы (Wikstrom and Krab 1986; Joliot and Joliot 1994). Об образовании H_2O_2 с участием комплексов ФС2 написано всего несколько предложений. Отмечается, что она образуется в результате дисмутации супероксидных радикалов. Возможные пути формирования H_2O_2 в ФС2 были описаны также в работах (T. Wydrzynski et al. Biochim Biophys Acta 1989, 973: 23-28; Klimov et al. Photosyn Res 1993, 38: 409-416). Эти исследования свидетельствуют о том, что генерация H_2O_2 в мембранных фрагментах ФС2 происходит на или вблизи марганцевого кластера комплекса окисления воды.

Считаю, что приведённые замечания носят частный характер и не снижают высокой положительной оценки работы.

Заключение. Диссертация Ветошкиной Д.В. является самостоятельной законченной научно-исследовательской работой на актуальную тему. Полученные автором результаты, касающейся участие H_2O_2 в регуляции размера антенны ФС2 существенно углубляют современные знания о сигнальных путях в высших растениях и открывают перспективы для выяснения механизма передачи сигнала от хлоропласта к ядру, необходимого для оптимизации уровня экспрессии ядерных генов. Разработанные экспериментальные подходы, позволяющие регулировать количество H_2O_2 в листьях, что может быть в дальнейшем использовано при исследовании роли пероксида водорода в различных процессах. Выводы диссертации четко обоснованы. Содержание автореферата отражает содержание диссертации. Работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор, Ветошкиной Дарьи Васильевны заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 «Биохимия».

Доктор биологических наук М.Д. Мамедов

Место работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химический биологии имени А.Н. Белозерского

Web-сайт организации: belozersky.msu.ru

Должность: Ведущий научный сотрудник отдела биоэнергетики НИИ физико-химический биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119992 Москва, Ленинские горы, д.1, стр.40

e-mail: mahirmamedov@yandex.ru Тел: +7 (495) 939 31 88

Мамедов Махир Джафар оглы

ПОДПИСЬ УДОСТОВЕРЯЮ
Зав. канцелярией