

ВІДГУК

офіційного опонента

**на дисертаційну роботу КОЗЕКО Людмили Євгенівни
«РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНИХ ШАПЕРОНІВ У ФЕНОТИПІЧНІЙ
ПЛАСТИЧНОСТІ РОСЛИН»,**

представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
зі спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Згідно з сучасною парадигмою, стійкість організмів до дії несприятливих чинників визначається неспецифічними і специфічними складовими та функціональною взаємодією цих складових. Синтез стресових білків є одним із базових механізмів неспецифічної стійкості рослин. Тим не менше цей механізм має і певні ознаки специфічності, тобто його прояв залежить від природи стресорів. Більше того, білки, які умовно називають «стресовими», «білками теплового шоку» (heat shock protein – HSP), є не тільки індукцйбельними, а й конститутивними і виконують певні функції за нормальних умов існування організму. Так, субстратна специфічність шаперонів родини HSP90 дозволяє розглядати їх як важливу регуляторну систему в процесах росту і формотворення.

При цьому особливості функціонування окремих представників родин HSP у рослин за нормальних і несприятливих умов середовища, механізми взаємодії системи HSP з іншими протекторними системами рослин залишаються малодослідженими. Зважаючи на це, дисертаційна робота Людмили Євгенівни КОЗЕКО, основною метою якої було з'ясування особливостей функціонування шаперонів родин HSP70 і HSP90 на молекулярному, клітинному і організмовому рівнях при забезпеченні діапазону стійкості, стабільності та пластичності розвитку рослин, є дуже актуальною.

Маючи виразне цитологічне спрямування, робота являє собою фундаментальне міждисциплінарне дослідження і вирішує один з аспектів проблеми адаптації одразу з позицій біохімії, молекулярної біології, цитології і гістології та системної біології.

Дисертація має структуру, близьку до класичної. Вона викладена на 439 сторінках і складається зі вступу, огляду літератури (два розділи), опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення (три розділи), аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел і додатків.

Перший розділ дисертації має назву «Стабільність і пластичність росту і розвитку рослинного організму». У першому його підрозділі наведений

аналітичний огляд сучасних уявлень про фенотипічну пластичність рослин. Автор, зокрема, відзначає, що явище фенотипічної пластичності нерозривно пов'язано з такими характеристиками процесу формування фенотипу як стабільність і пластичність розвитку, норма реакції та діапазон стійкості організму. На основі аналізу літератури дисертант відзначає, що «... функціонально важливе поєднання генетично детермінованого консерватизму морфології окремих частин з варіабельністю форми та розмірів всього тіла може вважатися основою високої пластичності рослинного організму при збереженні видової ідентичності».

У другому підрозділі характеризуються теоретичні аспекти стресу і адаптації рослин до несприятливих змін середовища (концепції Г. Сельє, Г. Ліхтенталер та ін.). Зазначається, що автором приймається положення про те, що стресова доза фактора є такою, що здатна суттєво порушувати гомеостаз організму. Наводиться перелік неспецифічних стресових реакцій. Основна думка: стрес є тимчасовим інструментом, призначеним лише для відновлення клітинного гомеостазу. Окремо розглядаються клітинні механізми відповіді рослин на певні абіотичні чинники.

Другий розділ огляду літератури наведено під назвою «Молекулярні шаперони/білки теплового шоку (HSP) як система контролю якості білка рослинних клітин». Особлива увага приділена нативно неструктурованим білкам, до яких належить майже третина білків еукаріотів, зокрема, до 70% білків сигналіну. Розглядаються механізми пошкодження білків під дією фізичних факторів та за участю активних форм кисню і азоту та ін. Дається визначення шаперонів, які тимчасово зв'язують і стабілізують нестабільні конформації інших білків і шляхом контрольованого зв'язування/вивільнення останніх сприяють правильному вибору їх подальшої «долі» – фолдингу, організації в олігомери, транспортуванню до відповідного компартменту чи деградації.

Автор обґрунтовує вибір для дослідження родин шаперонів HSP70 і HSP90, які присутні у великій кількості в клітинах як за нормальних, так і за несприятливих умов, функціонують у тісній кооперації між собою і виконують власні особливі функції при стресі. У цій частині огляду описано сучасні уявлення про функціональну структуру HSP70, аналізується вплив різних чинників на генну експресію та накопичення цієї родини стресових білків. Дисертант слушно відзначає, що, незважаючи на відомості про роль HSP70 у стійкості рослин, методичних підходів до широкого їх використання як індикатора стану рослин не розроблено.

Окремо аналізується родина HSP90. Наголошується, що білки-клієнти HSP90 у рослин беруть участь в регуляції стресової реакції. Розглядається

роль HSP90 у відповіді рослинних клітин на екстремальні температури, зневоднення, затоплення, дію зміненої гравітації. Відзначається, що недостатньо вивченою є здатність HSP90 підтримувати стабільність темпів росту і морфогенезу. Водночас з використанням мутантів *A. thaliana* за білками-клієнтами отримано прямі докази можливості приховування генетичних змін шаперонами HSP90. Так само важливого значення набувають поки що нечисленні дані стосовно впливу HSP70 на регуляторні процеси і, в результаті, на ріст і морфогенез рослин.

Підсумовуючи оглядові розділи, дисертант відзначає, що його робота спрямована на вивчення різних аспектів функціонування шаперонів у забезпеченні стабільності та пластичності росту і розвитку рослин. При цьому увага зосереджена на родинях HSP70 і HSP90, які відіграють важливу роль в всьому діапазоні умов середовища – від оптимальних до критичних. Слід відзначити, що огляд базується на актуальних сучасних даних, переважно на англomовних публікаціях. Автор для побудови гіпотез доречно залучає відомості щодо функцій і локалізації стресових білків не лише в клітинах рослин, а й тварин.

У розділі 3 детально описано матеріали і методи досліджень. Дається коротка характеристика модельних об'єктів, на яких проведено дослідження. Крім рослин арабідопсису, для досліджень використовувалися *Pisum sativum*, види родини *Malvacea*, повітряно-водний вид *Sium sisaroides*, водна рослина *Trapa natans* та ін.

Відповідно до поставлених мети і завдань автором використовувався комплекс сучасних молекулярно-генетичних (виділення і електрофоретичний аналіз ДНК і РНК, отримання κДНК, зворотна транскрипція і ПЛР-ампліфікація у режимі реального часу, рестрикційний аналіз, метод ДНК-комет), біохімічних (нативний і денатуруючий електрофорез, вестерн-блотинг, імуноферментний аналіз), гістохімічних та мікроскопічних, біоінформатичних (робота з базами даних, комп'ютерний аналіз нуклеотидних послідовностей) методів, а також методи математичної статистики.

Розділ 4 (перший експериментальний і найбільший за обсягом) присвячено ролі HSP70 і HSP90 у стійкості рослин до змін навколишнього середовища. Автор справедливо відзначає, що, незважаючи на велику кількість даних про генну експресію HSP, бракує системних досліджень відповіді багаточленних родин HSP рослин у забезпеченні діапазону стійкості за дії різних чинників та у видів рослин з різними адаптивними властивостями, в тому числі, у рослин природних популяцій.

Дисертантом встановлено профіль експресії генів всієї родини HSP70 в проростках *Arabidopsis thaliana* (Col-0) протягом експозиції при 37°C, вперше виявлено активацію генів *AtHSP70-6* і *AtHSP70-9*. Також відзначено посилення експресії генів родини HSP90. За водного дефіциту істотно зростала експресія *AtHSP70-4*, водночас експресія *AtHSP70-5* змінювалася слабо. Показана специфічність реакції окремих молекулярних форм *AtHSP70* і *AtHSP90* на певні стресори. На це вказують і дані автора, отримані з використанням нокаут-мутантів. Наприклад, зниження життєздатності при тепловому стресі та зниження ростової активності спостерігали у проростків *Athsp90-1* та *Athsp70-5*.

Результати аналізу показали наявність тканинспецифічності експресії *AtHSP70-10* і *AtHSP90-2*, що свідчить про певну специфічність функціонування відповідних шаперонів.

В окремому підрозділі наведені результати дослідження синтезу HSP70 як компонента неспецифічної стійкості і алкогольдегідрогенази (АДГ) як складової специфічної стійкості у рослин з різною стійкістю до затоплення. Індукція синтезу АДГ виявлена як у стійкого до затоплення *S. sisaroides*, так і у нестійкого *A. thaliana*. В обох видів вона певною мірою відставала від індукції HSP70, що підтверджує послідовну активацію систем загального захисту і анаеробної метаболічної адаптації.

Досліджено також участь HSP в реакції рослин на посуху. Результати аналізу різних за потребами до умов водозабезпечення видів підтвердили участь HSP70 в адаптації. Показано їх прогресивне накопичення протягом розвитку водного дефіциту. Разом з тим, вони засвідчують наявність видових особливостей і тісного взаємозв'язку характеру їх синтезу з фізіологічними змінами.

Порівняння базового вмісту шаперонів HSP70 в клітинах *T. natans*, *M. silvestris*, *M. pulchella*, *S. sisaroides* і *A. thaliana* свідчить, що цей показник також може мати суттєве значення для забезпечення діапазону стійкості рослинного організму.

В окремому підрозділі наведено дані автора про вплив кліноостатування і мікрогравітації на вміст HSP70 і HSP90. Показана роль HSP70 і HSP90 у крос-толерантності. Так, у рослин, які перед тепловим стресом зазнавали кліноостатування, синтез цих білків був сильнішим. Кліноостатування спричиняло невелике підвищення експресії генів п'яти цитозольних *AtHSP70s* і *AtHSP90-1* за нормальної температури, а також швидшу і потужнішу індукцію за гіпертермії. При цьому рослини з активнішим синтезом *AtHSP70s* і *AtHSP90-1* краще виживали за потенційно летального теплового стресу.

Розділ 4 завершується підрозділом про можливість використання HSP70 як біомаркера стану рослин в природних умовах. Тестування рослин 9 видів 6 родин за різних умов середовища показало наявність HSP70 у значній кількості за несприятливих умов і відсутність або присутність у малій кількості за умов, близьких до оптимальних, специфічних для кожного виду.

У розділі 5 наведено експериментальні дані про регуляцію генної експресії HSP і стійкості рослин шаперонами HSP90. Дисертантом встановлено посилення синтезу HSP при обробці рослин інгібітором активності HSP90 і підвищення їх базової та індукованої теплостійкості. Викладені у розділі результати досліджень дають підстави розглядати авторегуляцію синтезу HSP шаперонами HSP90 як важливий молекулярний механізм регуляції чисельності клітинного пулу шаперонів, що забезпечує стійкість клітин і рослинного організму до змін чинників середовища.

У розділі 6 розглядається роль HSP90 і HSP70 у фенотипічній варіабельності рослин. Він починається з викладення робочих гіпотез, згідно з якими ці білки можуть брати участь у підтриманні стабільності процесів росту, розвитку і формотворення рослин. Водночас зниження активності клітинного пулу HSP90 будь-яким способом може спричиняти послаблення різних сигнальних і регуляторних шляхів і, в результаті, дестабілізацію росту і розвитку рослин. Серед ключових результатів цього розділу варто відзначити посилення фенотипічної варіабельності рослин за їх обробки інгібіторами HSP90 гелданаміцином (ГДА) і радициолом, стимуляцію росту та прискорення розвитку в результаті обробки рослин ГДА після γ -опромінення сухого насіння, зниження виживаності гетерогенного за якістю, генетично поліморфного насіння та посилення варіабельності темпів росту і морфології проростків *A. thaliana* при зниженні функціональної активності шаперонів HSP90, збільшення частки проростків з морфологічними відхиленнями, при порушенні експресії окремих HSP90 і HSP70 як з числа конститутивних членів родин, так і індукцибельних. Крім того, аналіз нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* протягом онтогенезу продемонстрував посилення варіабельності темпів розвитку і ростових показників. Також виявлено, що фенотипічні аномалії проростків мутантних ліній можуть проявлятися або корегуватися на рівні окремого модуля, що вказує на те, що вплив HSP90 і HSP70 на визначення морфогенетичної програми може відбуватися дискретно на рівні модуля.

Після експериментальних розділів наводиться ґрунтовне узагальнення. Вперше в рамках єдиного комплексного дослідження проаналізовано та узагальнено різні аспекти функціонування шаперонів: їх значення як системи

неспецифічної стійкості за змін факторів середовища; здатність цитозольних HSP90 регулювати генну експресію HSP і тим самим контролювати чисельність клітинного пулу шаперонів; роль HSP90 і HSP70 у забезпеченні стабільності і пластичності росту, розвитку і формотворення. На основі отриманих даних і аналізу літературних джерел запропоновано модель, що поєднує різні функції шаперонів HSP90. Цікавими є результати, які свідчать про суттєві відмінності кінетики синтезу HSP70 у видів з різним адаптивним потенціалом та існування спільних закономірностей. Важливим є висновок про те, що окремі HSP – як конститутивні AtHSP90-4 і AtHSP70-14, так і індукцйбельні AtHSP90-1 і AtHSP70-5 – беруть участь у підтриманні стабільності каналізованого росту, розвитку і формотворення рослин протягом всього онтогенезу за нормальних умов, а також пластичних реакцій. Здатність системи HSP до авторегуляції, без сумніву, є фундаментальною властивістю клітини, яка становить основу автономного шляху забезпечення захисту її білкового гомеостазу за дії несприятливих чинників і репарації після завершення дії стресора.

Отже, дисертаційне дослідження Л.Є. Козеко є вагомим внеском у розвиток цитофізіології і стресології рослин. Автором переконливо показано участь шаперонів у забезпеченні стабільності та пластичності росту, розвитку і формотворення рослин, встановлено специфіку функціонування окремих представників цих мультигенних родин за нормальних умов та їх роль у забезпеченні стійкості клітин за дії несприятливих чинників середовища, показано HSP90-залежний механізм авторегуляції шаперонної системи клітини. Дисертантом вперше визначено тканинну специфічність експресії генів білків *AtHSP70-10* і *AtHSP90-2* у *A. thaliana* та показано зміни інтенсивності експресії цих генів за впливу стресорів при збереженні її локалізації. Вперше показаний віддалений у часі вплив інгібування функціонування HSP90 на стійкість рослинних клітин, ріст і розвиток рослин.

Робота є фундаментальним дослідженням, яке істотно розширює існуючі уявлення про особливості функціонування шаперонів у рослин. Водночас вона має цінні практичні відгалуження. Так, автором розроблено метод визначення стану рослин природних екоценозів та інтродукованих рослин, що базується на визначенні вмісту HSP70 за допомогою імунодетекції. Цей метод захищено патентом на корисну модель. Отримані автором результати стосовно регуляції синтезу HSP шляхом інгібування HSP90 закладають основи для створення нових технологій керування стійкістю рослин.

Дисертаційна робота викладена дуже логічно, легко читається, написана хорошою науковою українською мовою. У більшості експериментальних розділів і підрозділів міститься не лише обґрунтування конкретних цілей, а й наведені робочі гіпотези, що дозволяє відстежувати і так бездоганно логіку роботи. Варто також відзначити дуже добре продуманий спосіб візуалізації отриманих даних. На багатьох рисунках наведені і схема впливу на рослини досліджуваних чинників, і фотофакт, і кількісні дані.

Звичайно, у дисертаційній роботі можна знайти незначні недоліки.

1. При опису методики досліджень, що проводилися в природних умовах, відзначається, що «Для порівняння рослин природних популяцій двох видів *Sium* [...] відбір зразків проводили при температурі повітря 24°C після дощів, а також при температурі 41°C за відсутності атмосферних осадків протягом тривалого часу». Бажана була б конкретизація метеоумов в цілому із зазначенням років досліджень.

2. Відсутнє пояснення вибору режиму теплового стресу в лабораторних експериментах.

3. Не наведено посилання на використані методики електрофорезу ДНК і РНК в агарозному гелі.

4. У результатах дослідження кінетики синтезу HSP70 у зв'язку з теплостійкістю рослин сама стійкість різних видів характеризується лише напівкількісно (с. 195).

5. У висновку 4 автор пише: «Види з різними ареалами і адаптивним потенціалом [...] мають імуноспоріднені цитозольні HSP70, базовий рівень яких і ступінь активації при стресі позитивно *корелюють* зі стійкістю рослин до високої температури і затоплення». На наш погляд, вираз «позитивно корелюють» у такому контексті недоречний. Слово «кореляція» коректно вживати, коли її можна порахувати математично.

6. У роботі трапляються й інші невдалі вирази. Наприклад, поряд із загальноприйнятим у стресовій біології терміном «теплостійкість» використовується слово «термостійкість», доречне для технічних систем. Автор вживає вираз «розшифрований» геном (с. 115) замість «секвенований». Висновок 11 містить невдалий вираз «виживаність насіння».

Вказані недоліки жодним чином не впливають на загальну позитивну оцінку роботи. Дисертаційна робота Л.Є. Козеко є самостійною завершеною цілісною науковою роботою з високим ступенем новизни і практичного значення. Достовірність основних результатів підтверджена відповідними

показниками статистичної обробки. Автореферат повністю відображає основний зміст дисертації.

Результати дослідження широко опубліковані, у тому числі в таких відомих міжнародних журналах, як Life Sci. Space Res., Cell Tissue Biol., Microgravity Sci. Technology, J. Gravitational Physiol., Aquatic Bot. Всього за матеріалами дисертації автором опубліковано 74 праці, з яких 22 статті у провідних фахових виданнях. Варто відзначити, що понад половина публікацій автора є одноосібними. Робота широко апробована шляхом участі автора у міжнародних конференціях і симпозиумах, у тому числі країнах Євросоюзу. Дисертант добре відома науковій спільноті як фахівець з оригінальним науковим мисленням і бездоганний експериментатор.

В цілому, дисертаційна робота КОЗЕКО Людмили Євгенівни за актуальністю, обсягом і змістом повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України 23.07.2013 р. № 567, а її автор, безумовно, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Офіційний опонент
доктор біол. наук, професор,
зав. кафедри ботаніки і фізіології рослин
Харківського національного аграрного
університету ім. В.В. Докучаєва



Ю.Є. Колупаєв



Підпис  засвідчується
керівник відділу діловодства і канцелярії

Т. Маршала
20.09 р.