

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Людмили Євгенівни Козеко «Роль молекулярних шаперонів у фенотипічній пластичності рослин», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091-біологія)

Дисертаційна робота Людмили Євгенівни Козеко присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми, пов'язаної із встановленням ролі білків теплового шоку із родини молекулярних шаперонів HSP70 та HSP90 у забезпеченні фенотипічної пластичності рослин впродовж їх онтогенезу.

Для успішного виживання в умовах постійних змін навколишнього середовища рослини сформували мережу стратегій для акліматизації та адаптації. Одним з основних важелів цього складно регульованого механізму є зміни в новоутворенні ряду білків, індуковані дією ряду стресових чинників. В серії експериментів отримано нові дані щодо ролі цих білків у стійкості рослин до змін факторів середовища.

Про важливість та актуальність дисертаційної роботи свідчить і те, що вона виконувалася в рамках бюджетних фундаментальних науково-дослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Дисертаційна робота написана за класичною схемою. Мета досліджень та завдання дисертаційної роботи тісно пов'язані і поступово розкриті у вступі, основній частині, що містить 2 розділи огляду літератури, 3 розділи результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, узагальненні та висновках.

Зокрема в огляді дисертанткою приведено загальну характеристику процесу стабільності та пластичності росту і розвитку рослинного організму. Стан наукової проблеми, широкий спектр підходів до розуміння механізмів формування стійкості рослин до дії біотичних факторів докілья висвітлені в огляді літератури. Авторка добре володіє сучасним станом та розвитком напрямків досліджень по даній проблемі, про що свідчать посилання на використані першоджерела, викладено добре систематизований матеріал, спрямований на з'ясування особливостей метаболізму клітин рослин за умов дії абіотичних стресів. Детально описано сучасний стан уявлення щодо ролі білків теплового шоку із родини молекулярних шаперонів у метаболізмі клітин рослин. Розглянуто стан досліджень білків теплового шоку у рослин як адаптивного процесу у відповідь на дію стресових чинників.

Дисертаційна робота викладена на 347 сторінках друкованого тексту, у роботі наведено 23 таблиці та 118 рисунків, список використаних джерел містить 491 найменування.

Методика досліджень описана у розділі 3 **Методи дослідження**, який містить ряд підрозділів та повною мірою відповідає поставленим задачам. Високому рівню вірогідності наведених у дисертації результатів та

обґрунтованості зроблених висновків безумовно слугує використання широкого спектру сучасних методів досліджень: молекулярно-генетичні (виділення і електрофоретичний аналіз ДНК і РНК, отримання кДНК, зворотна транскрипція і ПЛР-ампліфікація у режимі реального часу, рестрикційний аналіз, метод ДНК-комет), біохімічні (нативний і денатуруючий електрофорез, вестерн-блотинг, імуноферментний аналіз), гістохімічні та мікроскопічні, біоінформатичні (робота з базами даних, комп'ютерний аналіз нуклеотидних послідовностей), феномний аналіз, методи математичної статистики.

Результати досліджень та їх обговорення, логічно структуровані та викладені у розділах 4-6.

Розділ 4. Присвячено дослідженню ролі HSP70 і HSP90 у стійкості рослин до змін навколишнього середовища. Для з'ясування особливостей функціонування окремих HSP у захисті білкового гомеостазу клітин при наблизенні фактору середовища до межі толерантності виду, проведено аналіз кінетики генної експресії 12 *HSP70* і всіх 9 *HSP90* *A. thaliana*. Досліджено вплив найважливіших для рослин факторів – температури і вологості, зокрема, високої температури і водного дефіциту, в дозах від помірних до потенційно летальних. Дисертанткою встановлено, що серед генів, що кодують білки органел, більш чутливими до високої температури виявились гени *AtHSP70-9* і *AtHSP70-10* мітохондріальних ізоформ.

Важливі результати Людмили Євгенівни щодо активації та високого рівня на початку експозиції конститутивних *AtHSP70-2* і *AtHSP90-2* вказують на те, що вони виконують роль важливого конститутивного компонента в ранній реакції. Слідом за ними активувалась транскрипція *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4*. Експресія ж *AtHSP70-3* і *AtHSP70-14* посилювалась за високої дози фактора. Дисертанткою відмічено потужну індукцію трьох генів: більш швидко в *AtHSP70-4*, рівень транскриптів якого наближався до максимуму в перші 30 хв, і далі спостерігали запуск експресії *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1*.

Результати оригінальних досліджень Людмили Євгенівни приведені в аналізі експресії генів *HSP70* і *HSP90* за поступового посилення водного дефіциту, який виявив потужну індукцію гена *AtHSP70-4* на фоні певного прогресивного підвищення рівня транскриптів більшості конститутивних членів цитозолу і органел. Індукція *AtHSP70-4* за дії теплового шоку випереджала індукцію двох інших індукцибельних генів. Результати, отримані в проведених дослідженнях вказують, що *AtHSP70-4* є основним індукцибельним членом двох родин, а *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1*, а саме компонентами, активно задіяними у стрес-реакції на високу температуру, і на низькому рівні – в адаптації до зневоднення клітин. Такі результати, на думку дисертантки, вказують на диференційну регуляцію і специфічність функціонування індукцибельних HSP в процесі формування реакції шаперонів на вплив досліджених чинників.

Вестерн-блот-аналіз, проведений Людмилою Євгенівною, показав, що стресова реакція клітин листків *A. thaliana* на підвищення температури вказує

на швидку, вже в перші 0,5 год, активацію синтезу HSP70, яка досягала максимуму через 2 год. Відмічено, що кількість його знижувалась до рівня нижче початкового за другу добу. Такий параболоподібний характер кінетики синтезу HSP70 відповідає кінетиці експресії відповідних генів в проростках цього виду.

Отримані Людмилою Євгенівною результати щодо терmostійкості мальви показали, що вона забезпечується шляхом потужного захисту білкового компоненту від теплової денатурації та деградації у верхніх листках та активної атракції метаболітів з нижніх листків. Аналізуючи різницю між видами, слід відмітити, що більш терmostійка *M. sylvestris* відрізнялась більш значною індукцією синтезу HSP70 протягом першої доби теплової експозиції, що вказує на більш потужну мобілізацію цієї захисної системи на початку дії стресу.

Переконливі результати описані у розділі 4.4.2. Кінетика синтезу HSP70 у зв'язку зі стійкістю рослин до затоплення. Дисертанткою встановлено, що у коренях *S. sisaroides* показана наявність як метаболічної анаеробної адаптації шляхом переключення енергетичного метаболізму клітин з окислювального фосфорилування на гліколіз та етанольну ферментацію, так і структурних змін, спрямованих на уникнення анаеробіозу. На початку затоплення в системі головного кореня активувався перший процес, тоді як збільшення об'єму міжклітинників було незначним і не призводило до утворення аеренхіми. Тобто в перші години гіпоксії роль метаболічної анаеробної адаптації, очевидно, є вирішальною.

Результати аналізу Людмили Євгенівни щодо різних за потребами до умов водозабезпечення видів підтверджують участь HSP70 в адаптації клітин, показуючи їх прогресивне накопичення впродовж розвитку водного дефіциту, і разом з тим вказують на видові особливості та тісний взаємозв'язок характеру їх синтезу.

Оригінальні результати приведені в розділі **4.5.1. Синтез HSP70 і HSP90 за впливу гіпергравітації**. Для вивчення ефектів гіпергравітації 5-добові етіольовані проростки *P. sativum* піддавали дії короткочасного гіпергравітаційного навантаження різної величини і тривалості. Методом вестерн-блотингу виявлено суттєві кількісні зміни HSP70 і HSP90 в клітинах проростків. Центрифугування протягом 15 хв призводило до активації синтезу HSP70, і цей ефект збільшувався зі збільшенням прискорення. Через 1,5 год реадaptaції після центрифугування кількість HSP70 знижувалась в проростках, які зазнали впливу 3 g і 7 g, однак продовжувало зростати в проростках після 10 g і 14 g. В результаті центрифугування протягом 1 год рівень HSP70 перевищив такий у контролі на 40-85%, залишався високим після 1,5 год реадaptaції і знижувався через 24 год.

У розділі 5 наведені результати дослідження регуляції генної експресії HSP і стійкості рослин білками теплового шоку із родини молекулярних шаперонів - HSP90. Наведені в цьому розділі результати підтверджують

гіпотезу авторегуляції синтезу HSP за принципом зворотного зв'язку і регуляції стійкості метаболізму клітин рослин білками HSP90.

Розділ 6 присвячено встановленню ролі HSP90 і HSP70 у фенотипічній варіабельності рослин. Наведені результати вказують на особливості функціонування окремих HSP. Наприклад, зміни ростових показників у мутантів *Athsp90-1* та *Athsp90-4* були специфічними стосовно органів та зовнішніх чинників, що, на думку дисертантки, можна пояснити залежністю від відповідних шаперонів певних субстратів. Порушення експресії *AtHSP70-5* в більшості варіантів призводило до зниження ростової активності. Мутація по *AtHSP70-14*, навпаки, в основному мало впливала на центральну тенденцію ростових показників.

Дисертаційна робота є цілісним, завершеним самостійним дослідженням Людмили Євгенівни Козеко ролі молекулярних шаперонів у фенотипічній пластичності рослин.

За результатами дисертаційної роботи було опубліковано 74 праці, з них 26 статей (в т.ч. 7 – у зарубіжних журналах), отримано патент України на корисну модель та 47 тез доповідей в профільних журналах та збірниках матеріалів конференцій.

Зміст автореферату повністю відображає структуру дисертаційної роботи Людмили Євгенівни Козеко. Висновки наведені в роботі є чіткими, достатньо обґрунтованими, вони логічно впливають з експериментальних даних отриманих Людмилою Євгенівною та повністю відображають їх зміст. Завершуючи аналіз дисертаційної роботи Людмили Євгенівни Козеко та високо оцінюючи в цілому дисертаційну роботу змушений висловити деякі зауваження.

Стосовно огляду літератури, не виявив повного знання досягнень вітчизняних вчених у дослідженні ролі білків теплового шоку у реакціях на температурний стрес та гіпоксію, зокрема П.С.Майор захистив дисертацію щодо впливу гіпоксії на метаболізм рослин. Він та І. Половинкін мають ряд статей щодо впливу низьких температур на синтез БТШ.

У розділі 4 на стор. 160 є опечатка, посилання на роботу Fridman, 2001, такої не існує, а автор є Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70: 603–64.

На сторінці 196 сказано: «Проте, порівняння кінетики синтезу і стану рослин після теплової експозиції доводить, що зниження вмісту HSP70 у клітинах у другій частині експозиції в даному випадку пов'язано не з адаптацією до нових умов, а з поступовою втратою шаперонами спроможності підтримувати білковий гомеостаз, і тому, очевидно, відповідає стадії виснаження у стресовій реакції», що не підтверджене експериментально стосовно втрати шаперонами спроможності підтримувати

білковий гомеостаз, зниження інтенсивності синтезу це не втрата спроможності підтримувати білковий гомеостаз.

На сторінці 200 «здатність рослин переносити довготривалий вплив високої температури корелює із здатністю до швидкої та прогресивної активації синтезу конститутивного HSP70 і потужної тривалої активації після певного лаг-періоду синтезу індукцйбельної ізоформи» вказано «корелює із здатністю», але ні на цій сторінці, ні на інших, де вживається це слово, я не виявив розрахунків щодо коефіцієнтів кореляції.

На мій погляд невдало сформовано на сторінці 270 вираз :«дисертантом висловлюється гіпотеза про участь HSP70 у підтримці стабільності процесів росту, розвитку і формотворення рослин за нормальних умов, та їх пластичних реакцій на зовнішні стимули». Ці білки давно та інтенсивно досліджуються у зв'язку процесу росту та розвитку росли і важко погодитися, що це гіпотеза саме Козеко Л.Є. слід сформулювати більш коректно та вказати, що саме зроблено по шукачем.

Однак ці незначні недоліки не знижують загального враження щодо якості роботи.

Підводячи підсумок роботи Людмили Євгенівни Козеко, слід зазначити, що дисертація є актуальним, оригінальним логічно завершеним дослідженням, виконаним на сучасному методичному рівні і має високу наукову та практичну цінність. Авторка проявила аналітичний склад мислення, вміння критично викласти та коректно інтерпретувати результати власних досліджень. Дисертація написана гарною мовою, акуратно оформлена, добре ілюстрована, отримані результати достовірні та статично оброблені.

На підставі викладеного, вважаю, що дисертаційна робота Людмили Євгенівни Козеко «Роль молекулярних шаперонів у фенотипічній пластичності рослин», за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів без сумніву відповідає вимогам п.п.11,12,13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091-біологія).

Завідувач відділу молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України, доктор біол. наук, професор 14.06.2019р.



В.С. Кравець

