

Відзив офіційного опонента
на дисертаційну роботу ОЛЕНЄВОЇ ВІРИ ДМИТРІВНИ
«ФУНКЦІОНАЛЬНА РОЛЬ АЦЕТИЛЮВАННЯ α -ТУБУЛІНУ
ПРИ РОЗВИТКУ СТРЕС-ІНДУКОВАНОЇ АУТОФАГІЇ
У *ARABIDOPSIS THALIANA*», поданої до захисту на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю
03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Дисертація Оленєвої В.Д. виконана у ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», що є відомим науковим центром в Україні з вивчення молекулярних механізмів впливу екстремальних чинників навколишнього середовища на рослинні організми. Відомо, що автофагія може слугувати захисним механізмом на дію екстремальних чинників в усіх еукаріотичних організмів. Автофагія передбачає розщеплення пошкоджених білків та органел з метою забезпечення клітин енергетичними матеріалами і субстратами, необхідними для здійснення життєво важливих біосинтетичних реакцій. У процесах автофагії важлива роль належить цитоскелету, зокрема, пост-трансляційній модифікації, наприклад, цитоскелетного білка α -тубуліну. Тому встановлення ролі ацетилювання α -тубуліну в механізмах стрес-індукованої автофагії у рослинній експериментальній моделі *Arabidopsis thaliana* є актуальною проблемою сучасної біології.

Відповідність роботи вибраній спеціальності. Дисертаційна робота Оленєвої В.Д. містить експериментальний матеріал, який за науково-методичними критеріями повністю відповідає спеціальності «03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія біохімія». Разом з тим, у роботі використані молекулярно-біологічні підходи, які надають їй міждисциплінарного характеру, що добре сприймається науковою громадськістю.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в рамках бюджетних НДР відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», а саме «Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (2011–2016 р.р., № ДР 0111U001597), «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій»

(2015–2019 р.р., № ДР 0115U002084) і “Дослідження відповіді рослин на дію абіотичних та біотичних чинників на клітинному та генетичному рівнях для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливого впливу змін кліматичних умов” (2017–2021 р.р., № ДР 0117U000909).

Наукова новизна одержаних результатів є добре зрозумілою. Дисертантка вперше встановила, як абіотичні стресові чинники впливають на ріст і розвиток проростків *A. thaliana*. Виявлено достовірне зменшення довжини коренів за дії різних стресових чинників. Однак, якщо пригнічення росту 7-денних рослин при опроміненні УФ-В, а також, метаболічному й осмотичному стресах сягало 15% і 23-25%, відповідно, то додавання 150 мМ NaCl до живильного середовища викликало зниження зазначеного показнику майже на 60%, порівняно з контрольними рослинами. Інгібування автофагії за допомогою інгібітора цистеїнових протеаз (E-64) призводило до ще більшого зниження показників росту рослини, порівняно з рослинами, що не зазнавали такого впливу. Це вказує на позитивний вплив автофагії на виживаність і розвиток рослин за умов стресу, що дозволяє припускати значення автофагії, як захисного й адаптивного механізму рослин у відповідь на дію стресових чинників.

Для вивчення молекулярних механізмів, які лежать в основі адаптивної ролі автофагії за дії екстремальних чинників на рослинний організм дисертанткою було створено трансгенну лінію *Arabidopsis thaliana*, яка стабільно експресує химерний білок Atg8h-eGFP. Використання методів флуоресцентної і конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії дозволило виявити ко-локалізацію флуоресцентного сигналу гібридного білка Atg8h-GFP і флуоресцентного барвника монодансилкадаверину - біохімічного маркера автофагосом. Якщо у контрольних рослин, які стабільно експресують химерний білок Atg8h-eGFP, спостерігали дифузну локалізацію сигналу Atg8h-eGFP, то у проростків, що зазнавали впливу абіотичних стресів, виявляли чіткі сигнали Atg8h-eGFP. Активний розвиток автофагії у коренях проростків, зокрема в клітинах кореневого чохла, епідермісу і перициклу, а також у клітинах провідної системи кореня спостерігали на 7-й день культивування за умов голодування, сольового та осмотичного стресів. Автофагія, індукована переліченими стресовими чинниками, не відбувалася за межами кореневої системи, тоді як опромінення рослин УФ-В призводило до автофагії як у коренях, так і наземних тканинах, зокрема, у гіпокотиліях.

Для підтвердження захисної ролі автофагії, як програмованої клітинної загибелі 2-го типу, дисертанткою використано TUNEL-аналіз клітин *A. thaliana*, в результаті чого виявлено суттєве зростання (до 18-21%) рівня програмованої загибелі клітин за метаболічного, сольового та осмотичного стресів й особливо за їхнього поєднання з дією інгібітора автофагії, порівняно з відносно невисоким рівнем (6%) програмованої загибелі клітин у контрольних рослин. Встановлення точних механізмів взаємозв'язків між автофагією і програмованою загибеллю клітин *A. thaliana* за дії екстремальних чинників вимагає додаткового дослідження, але їх виявлення є цікавим фактом, що повинен стати предметом майбутніх досліджень.

Для підтвердження на біохімічному рівні зв'язку автофагії з ацетилюванням α -тубуліну у дисертаційній роботі за допомогою Вестерн-блот аналізу визначено рівні GFP та ацетильованого α -тубуліну. При цьому враховували, що процесинг Atg8 передбачає відщеплення С-кінця молекули разом з GFP і тому рівень вільного GFP можна використовувати як показник активності автофагії в клітинах. На підставі такого аналізу встановлено, що усі досліджувані стресові чинники індукували як автофагію, так і зростання рівня ацетильованого α -тубуліну в клітинах. Оскільки внутрішньоклітинний транспорт автофагосом і автолізосом під час автофагії відбувається за участі цитоскелету, зокрема мікротрубочок, стабілізація останніх шляхом ацетилювання α -тубуліну може опосередковано вказувати на участь мікротрубочок у стрес-індукованій автофагії в рослинних клітинах.

У роботі також досліджено транскрипційну активність генів, продукти яких можуть бути залучені до стрес-індукованої автофагії. Це - гени α -тубулінів, ізотипів *atg8*, кінезинів, гексокіназ і гени, продукти яких відповідальні за ацетилювання α -тубуліну. Встановлено ко-експресію генів α -тубуліну й *atg8* за дії різних абіотичних екстремальних чинників, що вказує на роль цитоскелету в розвитку стрес-індукованої автофагії. Цікавим відкриттям тут є виявлення комбінацій генів, специфічних для певного виду стресу. Так експресія пари генів *tua1* і *atg8e* характерна для стресу, викликаного голодуванням, тоді як експресія генів *tub4* і *atg8a*, *atg8e* спостерігається під час опромінення УФ-В, експресія пари генів *tua3* і *atg8f* - при сольовому стресі, а експресія генів *tua3* і *atg8f*, *atg8e* - при осмотичному стресі. Профілі експресії генів *elp3*/деацетилаз і гексокіназ передбачають значення ацетилювання α -тубуліну під час автофагії, як форми програмованого відмирання клітин. В автофагії також можуть бути

задіяні рослинні кінезини, на що вказує зростання транскрипційної активності генів *KIN5B*, *KIN12B*, *KIN12F* за дії опромінення УФ-В, а також генів *KIN6*, *KIN7O*, *KIN7D*, *KIN12B* - за осмотичного стресу і генів *KIN6*, *KIN12B* – під час сольового стресу.

Науково-практична цінність роботи. Станом на сьогоднішній день, рецензована робота не має прямого виходу в практику, проте окремі висновки, що витікають з її результатів, можуть знайти застосування у біотехнології. Зокрема, результати, що вказують на роль ацетилювання α -тубуліну у реалізації стрес-індукованої автофагії у клітинах рослин, повинні лягти в основу з'ясування адаптивних механізмів до дії екстремальних чинників на рослини сільськогосподарського застосування. Зокрема, серед протекторів рослин до дії негативних чинників, у т.ч. глобальних змін клімату, можуть бути й регулятори процесів автофагії.

Апробація результатів дисертації. Дисертаційна робота Оленевої В.Д. пройшла достатню апробацію на чисельних міжнародних і вітчизняних наукових конференціях.

Мета роботи сформульована конкретно із зазначенням головних напрямків запланованого дослідження.

У дисертаційній роботі вирішували **7 основних завдань**, які чітко сформульовані й були необхідні для досягнення поставленої мети дослідження. Разом з тим завдання 5 «провести *структурно-біологічну оцінку* впливу пост-трансляційного ацетилювання α -тубуліну на його взаємодію з білком Atg8» звучить дивно щодо терміну «*структурно-біологічна оцінка*».

Методи дослідження, використані під час виконання дисертаційної роботи, є достатньо різноманітними, але, в цілому, адекватні спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Авторкою зроблено **7 висновків**, які узгоджуються з отриманими результатами дисертаційної роботи.

У списку робіт, опублікованих за результатами дисертаційної роботи, налічується 8 статей, серед яких стаття в журналі Cell Biol. Intl., 2017 (перший автор), в журналі Cytol. Genetics, 2018 (другий автор), в журналі Мол. прикл. генетика (Минск), 2017 (перший автор), Доповіді НАН України, 2018 (перший автор). 3 статті опубліковані у Збірнику наукових праць “Фактори експериментальної еволюції організмів” і 1 стаття – у Віснику українського товариства генетиків та селекціонерів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 147 сторінках друкованого тексту і містить 36 рисунків. Структура дисертації – традиційна. У списку використаних джерел налічується 174 посилань.

Особистий внесок здобувача добре зрозумілий з коментарів до результатів його співпраці за темою дисертаційної роботи, а також з того факту, що в 6-ти з 8-ми статей за темою роботи дисертантка є 1-м співавтором.

Крім висловлених вище зауважень до окремих частин дисертаційної роботи, в опонента є й деякі інші редакційні **зауваження**, а також ряд **запитань і побажань**, які викладені нижче.

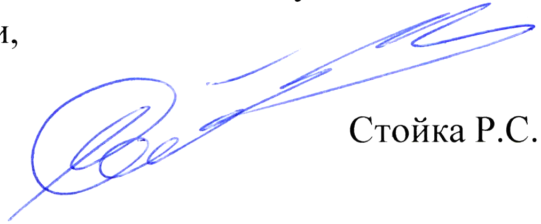
1. «Огляд літератури» базується на достатньо свіжих джерелах літератури, разом з тим, тут зустрічаються посилання на матеріали конференції (цитуються за №141 і 142), що не доцільно робити, оскільки у більшості випадків тези наукових конференцій не підлягають рецензуванню.
2. На стор. 31 використовується термін «детирозилування». Якщо тут мова йде про відщеплення залишку тирозину, краще було використати термін «детирозинілування».
3. Стор. 47: написано «некроз – другий тип ПКЗ (програмованої клітинної загибелі)». Чи це правильно?
4. Стор. 47: вживається сленговий термін «свелінг» - навіщо, коли є адекватний термін «набрякання».
5. На стор. 62 (та в інших місцях тексту дисертації) вживається термін «бар» - 0,5 см – навіщо, коли існує термін «шкала».
6. До Рис. 6.10 (стор. 78) необхідно пояснити, як нормалізували кількість білка, нанесеного на електрофореграму перед електрофорезом.
Для цього використовують: а) визначення експресії певного гена домашнього господарства; б) попереднє фарбування блоту з перенесеної електрофореграми фарбою Понсо S (червоний); в) визначення білкового сигналу неспецифічного білкового антигена.
7. Стор. 81 – Термін «Структурно-біологічна оцінка взаємодії...» - незрозумілий.
8. Стор. 110 (Рис. 6.28) і до стор. 113 (Рис. 6.31) – доцільно було дати на рисунках вказівні стрілки за результатами цитохімічного аналізу.

9. На стор. 120 (Узагальнення результатів дослідження) сказано: «Незначне зниження... рівня виживання клітин...» - що означає термін «незначне» - достовірне чи ні?

Висловлені вище редакційні зауваження нескладно виправити і тому вони не мають вирішального значення під час загальної оцінки дисертаційної роботи Оленевої В.Д.

Висновок. За актуальністю теми, методичним рівнем проведених досліджень, їх об'ємом, науковим і науково-практичним значенням одержаних результатів, а також адекватністю проведеного в роботі аналізу і відповідністю зроблених висновків, дисертаційна робота Оленевої В.Д. **«ФУНКЦІОНАЛЬНА РОЛЬ АЦЕТИЛЮВАННЯ α -ТУБУЛІНУ ПРИ РОЗВИТКУ СТРЕС-ІНДУКОВАНОЇ АУТОФАГІЇ У *ARABIDOPSIS THALIANA*»**, подана до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія відповідає вимогам ДАК МОН України до кандидатських дисертацій, а висловлені опонентом зауваження не є підставою для заперечення високої оцінки цієї роботи. Вважаю, що авторка дисертаційної роботи заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за вказаною спеціальністю.

Офіційний опонент,
завідувач відділу регуляції проліферації клітин та апоптозу
Інституту біології клітини НАН України,
доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України



Стойка Р.С.

Львів, 26 березня 2019 р.

Підпис члена-кореспондента НАН України Стойки Р.С. засвідчую:
Вчений секретар Інституту біології клітини НАН України,
к.б.н.



Барська М.Л.