

«Утверждаю»

Директор Института биофизики клетки РАН
чл.-корр. РАН Е.Е. Фесенко



27 ноября 2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Комаровой Анны Владимировны «Роль ионных механизмов и внутриклеточного латерального транспорта в регуляции светозависимых мембранных процессов растительной клетки», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Актуальность исследования.

Большинство биохимических процессов в клетке могут протекать с достаточной скоростью и эффективностью и в нужном направлении только, если они изолированы во времени и в пространстве за счет компартментализации в специализированных органеллах, мембранных структурах типа рафты и/или локализованы в виде макромолекулярных комплексов. В то же время, клетка должна функционировать как единое целое и, следовательно, требуется синхронизация и координация большинства физиологических процессов, протекающих в различных разделах клетки. Эта задача решается с помощью мембранного потенциала, любые локальные изменения которого практически мгновенно распространяются по поверхности плазматической мембраны, при участии внутриклеточных Ca^{2+} волн, за счет специализированных транспортных систем и/или с помощью циклоза – циркуляции цитоплазмы. В особой степени проблема координации физиологических функций различных внутриклеточных органелл и компартментов стоит для определенных растительных клеток, имеющих гигантские размеры, как в случае харовой водоросли. Диссертационная работа Комаровой А.В. выполнена в рамках обозначенной выше проблемы и направлена на выяснение роли циклоза в обеспечении латерального транспорта, внутриклеточной сигнализации и регуляции внутриклеточных процессов на примере фотосинтеза и трансмембранного переноса ионов водорода в плазмалемме и хлоропластах. Эти процессы исследовались в контексте реакции клеток водоросли на локальные световые воздействия и локальные механические повреждение клеточной стенки, и поэтому выявленные в работе явления можно

рассматривать как своего рода защитные реакции. Результаты работы расширяют представления о путях повышения устойчивости растительных клеток к стрессовым механическим воздействиям, что в перспективе может иметь не только теоретическое, но и практическое значение. В свете изложенного, исследование, предпринятое Комаровой А.В., несомненно является актуальным и целесообразным.

Научная новизна.

В настоящее время хорошо известно, что харовые водоросли и листья водных растений образуют на свету распределенные по поверхности кислые и щелочные зоны в качестве приспособления к обитанию в слабощелочных водоемах. В данной работе впервые показано, что внеклеточные щелочные зоны (с pH до 10.0) возникают при создании микродефекта в клеточной стенке, причем в основе этого явления лежат физико-химические процессы, такие как растяжение плазматической мембраны под действием внутреннего гидростатического давления в зоне ослабленной клеточной стенки и открывание путей для проникновения Ca^{2+} в цитоплазму. Показано, что фотосинтетическая активность хлоропластов способствует локальному образованию щелочных зон при микроперфорации; при этом взаимодействия хлоропластов и плазмалеммы могут осуществляться дистанционно – при участии потока цитоплазмы.

Впервые показано, что поток цитоплазмы участвует в дальнодействующих взаимодействиях хлоропластов, выявляемых по задержанным изменениям флуоресценции хлорофилла на значительном удалении от места локального освещения. Установлено, что дистанционный механизм регуляции фотосинтеза полностью подавляется при остановке движения цитоплазмы ингибитором актина. Таким образом, выявлен новый механизм внутриклеточной регуляции при участии кругового движения цитоплазмы, связанный с индукцией трансмембранных ионных потоков и изменением состояния фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

Адекватность методов и достоверность полученных результатов.

Достигнутые успехи во многом обусловлены удачным выбором объекта и методов исследования. Харовые водоросли, эволюционно близкие к высшим растениям, проявляют на уровне отдельной клетки многие фундаментальные биологические свойства, такие как способность к фотосинтезу, движение цитоплазмы, возбудимость и репарация повреждений. К преимуществам изолированных клеток междуузлий относятся их крупные размеры, расположение хлоропластов в виде одиночного слоя, максимально известные скорости течения цитоплазмы и отсутствие осложняющих межклеточных взаимодействий. Работа выполнена с применением современных

электродных и оптических микрометодов, позволяющих судить о фотосинтетической активности и трансмембранных потоках H^+ на микроучастках клеток *in vivo* при точечном освещении клетки на заданном расстоянии от анализируемой зоны. Используемая методология изложена в достаточных подробностях, что позволяет получить ясное представление о том, как и с какой целью проводились конкретные эксперименты. Достоверность полученных результатов основана на высокой разрешающей способности методов, многократном воспроизведении экспериментов и статистической обработке регистрируемой цифровой информации.

Отмечу также, что основные результаты диссертации обсуждались на представительных международных конференциях и опубликованы в авторитетных международных и отечественных журналах, включая *Biochimica et Biophysica Acta*, *Protoplasma*, *European Biophysics Journal*, т.е. прошли достаточно жесткий экспертный анализ.

Основные полученные результаты и их теоретическая значимость. Экспериментальному разделу работы предшествует обзор литературы, в котором харовые водоросли представлены как удобный объект для исследования H^+ -насоса растительных клеток, ионных каналов возбудимых мембран, актин-миозиновых взаимодействий, а также пространственной самоорганизации фотосинтеза и ионных потоков. Рассмотрены данные о неоднородном светозависимом распределении рН и фотосинтетической активности, механизмы кругового движения цитоплазмы и ответные реакции растительных клеток на механический стресс. Анализ литературы завершается постановкой актуальных задач, решение которых стало предметом диссертационной работы.

Описание экспериментов выполнено с необходимыми и достаточными подробностями, их целесообразность вполне обоснована, полученные данные адекватно представлены в приведенных рисунках, высокой иллюстративности и графического качества. В первой части показано, что микроперфорация клеточной стенки стеклянной микропипеткой вызывает быстрое повышение рН на поверхности клетки в области повреждения (до рН 9.5–10), которое опосредовано растяжением плазмалеммы и поступлением Ca^{2+} из среды в цитоплазму. Профили распределения стационарного уровня рН в области микроперфорации, а также кинетические кривые сдвигов рН на разном удалении от точки укола свидетельствуют о локальном характере изменений (на площади с радиусом 50–100 мкм) и согласуются с предположением о диффузии в цитоплазме ионов Ca^{2+} как фактора активации H^+ проводимости. Кроме того, изменения рН при точечной перфорации зависят от

фотосинтетической активности хлоропластов, экспорта в цитоплазму продуктов светового метаболизма и переноса метаболитов с потоком цитоплазмы. Полученные результаты создают основу для гипотетической схемы процессов, развивающихся при микроповреждении, которые направлены на повышение прочности клеточной стенки.

Функциональная роль течения цитоплазмы в латеральном распространении метаболитов, экспортируемых освещенными хлоропластами, рассмотрена подробно во второй части раздела «Результаты и интерпретация». Показано, что локальное освещение участка клетки интенсивным светом вызывает распространение волны возрастания фактической флуоресценции хлорофилла F' в слабо освещенных частях междоузлия, расположенных вниз по течению цитоплазмы, но не оказывает влияния на свечение хлоропластов, расположенных вверх по течению от источника яркого света. Зависимость обнаруженных изменений флуоресценции от расстояния между источником света и областью измерений и их полное подавление при остановке движения в присутствии ингибитора актина (цитохалазин D) убедительно доказывает существование дистанционной регуляции фотохимической активности фотосистемы 2. Этот механизм регуляции связан с переносом восстановительных эквивалентов в потоке цитоплазмы из зоны яркого освещения в затенённые части клетки. Функционирование этого механизма нарушается после темновой адаптации клетки, а его восстановление на свету характеризуется периодом индукции, необходимым для активации ферментов цикла фиксации углекислоты.

Научная ценность и новизна полученных результатов несомненны, они вносят существенный вклад в существующие представления о роли латерального транспорта, опосредованного циклозом, в регуляции фотосинтеза и репарации повреждений. Работа А.В. Комаровой является новаторской как методологическом отношении, так и с точки зрения спектра принципиальных вопросов, обозначенных в ней.

Замечания по диссертационной работе.

При ознакомлении с материалами диссертации возникают определенные вопросы и замечания. Основное сводится к следующему:

1. Опираясь на полученные данные, автор предполагает, что в месте прокола клеточной стенки внутриклеточное гидравлическое давление вызывает растяжение плазмолеммы и активацию Ca^{2+} -проницаемых механо-чувствительных каналов. Это приводит к локальному вход Ca^{2+} и стимуляции протонных каналов. Между тем, идентифицированные на данный момент H^+ -каналы на прямую не стимулируются Ca^{2+} . Авторам следовало бы предложить механизм сопряжения входа Ca^{2+} и входа H^+ , основываясь на имеющихся литературных данных.

2. В ряде экспериментов авторы обрабатывали клетки цитохалазином Б, который должен был разрушить актиновый цитоскелет и, следовательно, подавить механочувствительный вход наружного Ca^{2+} , поскольку активность механочувствительных каналов, как правило, зависит от взаимодействия с актиновым цитоскелетом. Это предположение качественно согласуется с медленной и невыразительной реакцией части клеток, обработанных цитохалазином Б, на механическое возмущение (Рис.20, кривая 3). Между тем, в ряде случаев механическое возмущение вызывало формирование щелочной зоны с задержкой до 100 с, но в остальном клеточный ответ был идентичен контрольному (Рис.20, кривая 2). Этот феномен автор объясняет остановкой циклоза, хотя циклоз лишь незначительно искажает кривую распределения внеклеточного pH (Рис.10), свидетельствуя о том, что форма кривой преимущественно определяется диффузией интермедиата, которым является ион Ca^{2+} , по мнению автора. Мне представляется, что 100 с задержку ответа при неизменной кинетике и амплитуде трудно объяснить только в рамках развиваемых представлений. Вероятно, диссертантом упущен еще какой-то процесс, зависящий от состояния актинового цитоскелета, который вовлечен в рассматриваемое явление.

Заключение

По актуальности поставленных задач, по объему выполненной работы и по уровню полученных экспериментальных результатов проведенное Комаровой А.В. исследование является работой высокого уровня. Высказанные замечания не снижают высокой оценки рецензируемой диссертационной работы, которую можно квалифицировать как законченное исследование, содержащее весомые научные данные. Выводы обоснованы и адекватны полученным результатам. Автореферат в достаточной степени отражает содержание диссертации.

Материалы диссертации могут быть рекомендованы для внедрения и дальнейшего развития в лаборатории фотосинтетического электронного транспорта Института фундаментальных проблем биологии (Пущино), на кафедре биофизики биологического факультета Нижегородского государственного университета им. Лобачевского, в лабораториях мембран растительной клетки и фотосинтеза Института физиологии растений РАН им. Тимирязева, на кафедре физиологии растений биологического факультета МГУ имени Ломоносова, в Институте физико-химической биологии им. Белозерского при МГУ имени Ломоносова, на кафедре физиологии и

биохимии растений Санкт-Петербургского государственного университета, на Биологическом факультете Мордовского государственного университета (Саранск).

В своей совокупности изложенное позволяет прийти к заключению, что по своей актуальности, научной новизне и теоретической и практической значимости рецензируемая диссертационная работа полностью соответствует всем требованиям («Положение о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Комарова А.В., заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика».

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре Института биофизики клетки РАН 15 ноября 2016 года (протокол №9).

Станислав Сергеевич Колесников
Заведующий лабораторией
Молекулярной физиологии клетки ИБК РАН
д.б.н., профессор



СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН),
Адрес: 142290, г. Пущино, Московской обл., ул. Институтская 3, ИБК РАН
Телефоны: (4967) 73-05-19; (4967)33-05-09
Факс: (4967) 33-05-09
Электронная почта: admin@icb.psn.ru
Адрес сайта: <http://www.icb.psn.ru>

Список основных публикаций Ведущей организации по теме диссертации за последние 5 лет:

1. Kataev A.A., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Solonin A.S., Ternovsky V.I. *Bacillus cereus* can attack the cell membranes of the alga *Chara corallina* by means of HlyII. *Biochim Biophys Acta*, 2012, V.1818 (5), P.1235-1241.
2. Romanov R.A., Bystrova M.F., Rogachevskaya O.A., Sadovnikov V.B., Shestopalov V.I., Kolesnikov S.S. (2012) Dispensable ATP permeability of Pannexin 1 channels in a heterologous system and in mammalian taste cells. *J. Cell Sci.* 125, 5514–5523.
3. Roshchina V.V., Yashin V.A., Yashina, A.V., Gol'tyaev M. V. Chapter 17. Microscopy for modelling of cell-cell allelopathic interactions. In : *Allelopathy. Current Trends and Future Applications.*, Eds. Cheema, Z. A.; Farooq, M.; Wahid, A. (Eds.), 2012, IX, 673 p. 50 illus. Heidelberg, Berlin : Springer. 2012, Pp. 407-427.
4. Катаев А.А., Жерелова О.М., Грищенко В.М. Олеиновая кислота - модулятор ионных каналов плазмалеммы клеток харовой водоросли *Chara corallina*. *Биологические мембраны*, 2012, Т.29 (3), С.1-8.
5. Roshchina V.V. Vital autofluorescence: Application to the study of plant living cells. *International Journal of Spectroscopy*, 2012-2013, V.2012. ID 124672. P. 1-14. doi: 10.1155/2012/124672.
6. Roshchina V.V. Model systems in the study of the secretory function of higher plants. Berlin, Heidelberg, Springer, 2014, 198 pp.
7. Roshchina V.V., Yashin V.A., Kuchin A.V., Kulakov V.I. Fluorescent analysis of catecholamines and histamine in plant single cells. *International Journal of Biochemistry, Photon* 2014, V. 195, P. 344-351.
8. Roshchina V.V. and Yashin V.A. Neurotransmitters catecholamines and histamine in allelopathy: Plant cells as models in fluorescence microscopy. *Allelopathy Journal*, 2014, V.34 (1), P.1-16.
9. Roshchina V.V. New Tendency and Perspectives in Evolutionary Considerations of Neurotransmitters in Microbial, Plant, and Animal Cells. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015, Vol. 874 . Series: Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health. Lyte M, (Ed). New York, Heidelberg: Springer International Publishing. Chapter 2. P. Doi: 10.1007/978-3-319-20215-0
10. Cherkashin A.P., Kolesnikova A.S., Tarasov M.V., Romanov R.A., Rogachevskaya O.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. (2016) Expression of calcium-activated chloride channels Ano1 and Ano2 in mouse taste cells. *Pflugers Archive-European Journal of Physiology* 468, 305-319.

Ученый секретарь ФГБУН ИБК РАН

к.б.н. Масулис Ирина Станиславовна

«22» нояб

2016 г.

