

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук Емельянова Владислава Владимировича
на диссертационную работу **Мазиной Анастасии Борисовны**
«NO-индуцируемая экспрессия аутофагических генов и S-нитрозилирование
белков в клетках корней пшеницы»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Диссертационная работа А.Б. Мазиной посвящена изучению молекулярных механизмов регуляции аутофагии, опосредованной оксидом азота (NO), в клетках высших растений. Изучение процесса аутофагии и его молекулярных механизмов имеет недолгую, но успешную историю, где предпочтения в качестве модельных объектов отдается клеткам дрожжей или млекопитающих. В растениях аутофагия также активно изучается, однако биохимические и генетические особенности аутофагических процессов у них исследованы довольно фрагментарно и недостаточно полно. Расшифровка механизмов, контролирующих индукцию, развитие или ингибирование аутофагии, может способствовать разработке способов борьбы с патологиями и повышения резистентности растительного организма к широкому спектру воздействий. Особый интерес представляет изучение особенностей аутофагии в растениях, обладающих высокой стрессовой устойчивостью, таких как бриофиты, эволюционно древние высшие несосудистые растения. В связи с этим, тема диссертационной работы А.Б. Мазиной имеет как фундаментальную значимость, поскольку направлена на выявление тонких молекулярных механизмов регуляции аутофагии в клетках высших растений, так и прикладную актуальность, поскольку мягкая пшеница – одна из наиболее востребованных сельскохозяйственных культур. Работа является составной частью исследования, проводимого в течение ряда лет в лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

Диссертационная работа А.Б. Мазиной изложена на 160 страницах машинописного текста, включает 21 рисунок, 5 таблиц и приложение,

состоящее из 7 рисунков и 6 таблиц. Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми ВАК. Работа построена по традиционному принципу и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложение. Список цитируемой литературы включает 208 источников, из которых 205 – на английском языке.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность выбранной темы. Как отмечает автор, в литературе имеются противоречивые данные о роли NO в регуляции аутофагии, свидетельствующие как об ингибировании, так индукции аутофагических процессов при действии доноров NO. Изучение NO-опосредованных механизмов аутофагии в клетках животных, в частности, S-нитрозилирования белков, становится «горячей темой» для обсуждения. К сожалению, информация о посттрансляционных модификациях, которым подвергаются белки во время аутофагии в клетках растений, почти отсутствует. Основываясь на анализе имеющейся информации, диссертант сформулировал цель и задачи исследования, охарактеризовал научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, сформулировал основные положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы», изложенная в четырех разделах, представляет собой детальный анализ классических и современных представлений об основных особенностях процесса аутофагии и его физиологическом значении для растительного организма. Особое внимание А.Б. Мазина уделила рассмотрению молекулярных механизмов аутофагии, в частности, последовательному взаимодействию белковых комплексов в ходе формирования аутофагосомы. Автор описывает не только системы конъюгации аутофагических белков, но и анализирует возможную роль мультифункциональных белков, в том числе АМФ-зависимой протеинкиназы SnRK1 и фермента гликолиза глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Кроме того, автор подробно рассматривает редокс-зависимые

регуляторные механизмы аутофагии, фокусируя свой интерес на NO-опосредованных посттрансляционных модификациях белков. В завершение Обзора литературы в кратком заключении автор аргументирует проведение собственного исследования, критически отмечая противоречивость имеющихся в литературе данных об NO-опосредованной регуляции аутофагии в клетках млекопитающих, а также недостаток информации о влиянии активных форм азота на аутофагические процессы в клетках растений.

Экспериментальная часть работы начинается с подробного описания объектов исследования и методов, использованных в диссертации. Хотелось бы отметить, что для достижения поставленной цели автором были использованы проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и побеги мха *Dicranum scoparium* Hedw.. Выбор объектов представляется удачным, поскольку использование высших растений из разных монофилетических групп позволило автору проанализировать эволюционные аспекты аутофагии. В ходе выполнения работы А.Б. Мазиной была решена важная методическая проблема идентификации путем клонирования и секвенирования аутофагических генов *D. scoparium*, мха, чей геном ещё не секвенирован. Особую сложность представлял анализ S-нитрозилированных белков пшеницы. Известно, что S-нитрозилирование – это обратимая посттрансляционная модификация, которая чрезвычайно лабильна и чувствительна к воздействию внешних факторов, что делает её изучение довольно затруднительным. Для выполнения поставленных задач автором применялся широкий круг биоинформатических, биохимических и молекулярно-генетических и микроскопических методов, в частности, иммунодетекция и иммуноцитохимическая визуализация белков; клонирование и секвенирование генов; анализ экспрессии генов с помощью количественной ПЦР в реальном времени; идентификация S-нитрозилированных белков с помощью Nano LC-MS/MS анализа; биоинформатическое предсказание белок-белковых взаимодействий. Несомненно, эффективное использование

методических приемов и получение достоверных результатов потребовало от автора кропотливости, тщательности и трудолюбия.

Результаты диссертационной работы А.Б. Мазиной изложены последовательно и раскрывают суть выполненного исследования. Интересным аспектом работы является сравнительный анализ аутофагических генов пшеницы и эволюционно древнего высшего несосудистого растения – мха *Dicranum scoparium*. Показано, что все идентифицированные аутофагические гены обладают мотивами и консервативными участками, свойственными для *ATG* генов высших растений. Белки мха обладают классической структурой с характерными консервативными доменами и имеют высокую гомологию с другими *ATG* белками бриофитов и некоторых высших сосудистых растений, в то время как, белки пшеницы обладают аминокислотными заменами. Автор делает справедливый вывод, что всё это подтверждает консервативность аутофагических генов и белков и их важность для жизнедеятельности растений в ходе эволюции.

Большой раздел главы результатов посвящен анализу экспрессии аутофагических генов в проростках пшеницы и побегах мха при действии доноров оксида азота. Автором показано повышение уровня экспрессии генов, кодирующих аутофагические белки, которые вовлечены в разные этапы формирования аутофагосом. Кроме того, показано, что в проростках пшеницы экспрессия генов, кодирующих *SnRK* и *GAPDH*, также была чувствительна к изменению уровня оксида азота в клетках. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активные формы азота являются важными регуляторами аутофагии в клетках растений.

Одним из основных достижений диссертационной работы А.Б. Мазиной является убедительное доказательство того, что стресс-индуцируемая аутофагия в клетках корней пшеницы сопровождается повышением уровня S-нитрозилированных белков. Это подтверждается целым спектром

экспериментальных и теоретических данных: во-первых, посредством визуализации S-нитрозилированных белков методами иммуноцитохимии и вестерн-блотта, во-вторых, с помощью биоинформатического предсказания возможных сайтов S-нитрозилирования в аутофагических белках. В-третьих, с помощью дериватизации нитрозогруппы и дальнейшего Nano LC-MS/MS анализа были идентифицированы белки и их сайты S-нитрозилирования. Моделирование белок-белковых взаимодействий между аутофагическими белками и идентифицированными S-нитрозилированными белками позволило автору высказать предположение о механизмах NO-опосредованной регуляции аутофагии.

Таким образом, в диссертации А.Б. Мазиной представлены оригинальные данные, отличающиеся новизной и представляющие фундаментальную и практическую значимость. Результаты исследования иллюстрированы наглядными рисунками и таблицами. Полученные результаты подвергнуты тщательному обсуждению с аргументированной интерпретацией и применением данных литературы. Выводы в диссертационной работе сформулированы достаточно четко и полностью соответствуют задачам проведенного исследования.

При общем благоприятном впечатлении и положительной оценке диссертационной работы А.Б. Мазиной хотелось бы высказать некоторые замечания и задать вопросы, которые, впрочем, носят лишь дискуссионный характер.

1. К сожалению, в последнее время, в научной литературе термин «экспрессия» часто необоснованно применяется не только к генам, которые действительно экспрессируются, но и к белкам или даже метаболитам, которые синтезируются, накапливаются, аккумулируются и т.п. Эта проблема не миновала и настоящее исследование. Также некоторые гены в тексте работы не отформатированы курсивом.

2. Как учитывалась лабильность S-нитрозилирования белков при пробоподготовке образцов?
3. В качестве пожелания можно порекомендовать в перспективе подтвердить роль GAPDH и SnRK в регуляции аутофагии на белковом уровне. Это могло бы усилить сделанные в работе выводы.
4. В тесте диссертации, преимущественно в разделе «Материалы и методы», присутствуют технические недочеты в виде опечаток и ошибочной пунктуации.
5. В корнях пшеницы среди S-нитрозилированных белков при действии индукторов аутофагии был обнаружен α -тубулин. Хотелось бы прояснить, почему среди прочих функций этого белка цитоскелета диссертант акцентировал внимание на его участии в формировании клеточной стенки?

Высказанные вопросы и замечания не носят принципиального характера и не умаляют оригинальности и достоверности полученных данных. Более того, работа А.Б. Мазиной, несомненно, имеет перспективы развития.

Заключение. Диссертация Мазиной Анастасии Борисовны посвящена актуальной теме. В результате проделанной работы поставленные задачи полностью решены автором на современном научно-методическом и теоретическом уровне. Её результаты опубликованы в виде 4 статей в журналах, включённых в список ВАК и международные базы цитирования Scopus и WoS. Материалы диссертации были представлены на многочисленных всероссийских и международных конференциях. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Автореферат и опубликованные работы отражают содержание диссертации.

Таким образом, учитывая актуальность и научную значимость, новизну полученных результатов, высокий теоретический и экспериментальный уровень работы, аргументированность выводов, считаю, что диссертационная работа А.Б. Мазиной является завершённой научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение одной из приоритетных задач

физиологии и биохимии растений. Диссертация Мaziной Анастасии Борисовны «NO-индуцируемая экспрессия аутофагических генов и S-нитрозилирование белков в клетках корней пшеницы», соответствует требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции от 18.03.2023 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор Мазина Анастасия Борисовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

4 декабря 2023 г.

Официальный оппонент

Емельянов Владислав Владимирович,

Доцент кафедры генетики и биотехнологии
Санкт-Петербургского
государственного университета,
кандидат биологических наук
специальность 1.5.21. –
физиология и биохимия растений

Емельянов В.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9

Тел. +7(812) 36 36 105

E-mail: v.yemelyanov@spbu.ru

<http://spbu.ru/>

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ
В.В. Емельянова
ЗАВЕРЯЮ



ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПбГУ
Н.К. КОРЕЛЬСКАЯ

4.12.2023.