

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических
наук ФЕДОРОВОЙ Елены Эриковны на тему: «Эндомембранная система
клеток корневого клубенька бобовых растений в условиях
азотфиксирующего симбиоза» по специальности 1.5.21 Физиология и
биохимия растений

Актуальность темы. Основная масса азота, содержащегося в живых организмах, обязана своим происхождением уникальной группе микроорганизмов-азотфиксаторов, которые ассимилируют молекулярный азот атмосферы, восстанавливая его до аммиака. Некоторые виды растений в ходе эволюции приобрели способность вступать в симбиотические отношения с бактериями-азотфиксаторами, цианобактериями и актиномицетами (Actinobacteria). К группе симбиотических азотфиксаторов, образующих клубеньки на корнях бобовых растений, относятся бактерии родов *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photorhizobium*, *Rhizobium* и *Sinorhizobium*. Процессы инфицирования и колонизации тканей клубеньков ставят вопрос о том, как растение-хозяин сосуществует с ризобиями, не запуская защитную реакцию? Этот вопрос особенно актуален ввиду очевидного сходства между ризобияльной и патогенной инфекциями. Ключевую роль здесь играют процессы распознавания в *системе «свой — чужой»*, а именно синтез и рецепция сигнальных молекул, продуцируемых обоими партнерами. Обмен информацией между растением и микроорганизмами реализуется через обширную контактную поверхность эндомембранной системы клеток бобовых растений — так называемый *симбиотический интерфейс*. Однако молекулярные и цитологические механизмы, лежащие в основе интеграции эндомембранной системы клетки-хозяина и поддержания колонии азотфиксирующих бактерий пока изучены крайне слабо.

Содержание и оформление диссертации. Диссертация Е.Э. Федоровой изложена на 228 страницах и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Методические подходы и использованные материалы, Результаты и обсуждение, Заключение и Выводы. Список литературы содержит 416 ссылок. Работа иллюстрирована 68 рисунками и 4 таблицами.

Обзор литературы, изложенный в главе 1, включает 24 раздела. Е. Э. Федоровой рассмотрены фундаментальные аспекты биологической азотфиксации: от роли нитрогеназы и бобовых в биосфере до эволюции симбиоза и характеристики наиболее распространённых видов растений-хозяев. Отдельный блок посвящён молекулярным механизмам инициации симбиоза, включая сигнальные пути с участием Nod-факторов и фитогормонов, защитные реакции растений и процессы проникновения ризобий в клетки коры корня. Автором подробно проанализированы типы роста корневых клубеньков, и функциональная организация зон их развития. Особое внимание уделено формированию и функциям симбиосом, перестройке мембранных компартментов клетки, механизмам поддержания бактериальной колонии внутри клетки, динамике цитоскелета, а также специфике транспортных процессов в клубеньках. Завершается обзор анализом механизмов деградации симбиотической системы при старении.

Методические подходы и использованные материалы. Для выполнения поставленных задач Е.Э. Федорова использовала самые современные молекулярно-биологические и микроскопические методы: анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени, два разных подхода молекулярного клонирования (рестрикционное клонирование с использованием пар ферментов (HindIII–KpnI и BamHI–EcoRI) и система Gateway от Invitrogen), конфокальную и электронную микроскопию, иммунодетекцию и иммулокализацию белков, анализ ферментативной и азотфиксирующей активности, а также методы изучения клеточных структур (окрашивание цитоскелета, каллозы, пектина и др.).

Главу "Результаты и обсуждение" диссертант разделила на 13 разделов. Впервые установлено, что в процессе инфицирования и выхода в клетку клубенька мембраны симбиосом не приобретают маркеров эндоцитоза, что, вероятно, предотвращает их немедленный лизис на начальном этапе колонизации. Одновременно в инфицированной клетке репрессируются гены *VPS11* и *VPS15* вакуолярного комплекса HOPS (Homotypic fusion and Protein

Sorting), который играет ключевую роль в процессах, связанных с вакуолями и везикулярным транспортом. Это приводит к дефункционализации вакуоли: теряется её кислый pH и литические свойства, а объём сокращается до ~30 % объёма клетки (против 60–90 % в неинфицированных клетках).

Е. Э. Федоровой клонированы и исследованы гены и белки, контролирующие эндоцитоз и везикулярный транспорт: малые GTPазы (Rab5, Rab7) и белки, относящиеся к комплексу слияния мембран, специфичному для мембран эндосом и тонопласта (t-SNAREs): SYP21/22, SYP51/52, VTI11, VPS11, VPS15). Показано, что необходимым компонентом симбиотических отношений являются SNARE-белки VAMP71, которые участвуют в образовании симбиосом, везикулярном транспорте сигнальных молекул и питательных веществ.

Для выяснения механизмов векторности транспорта везикул с мембранным материалом к симбиосомному интерфейсу инфицированной клетки Е. Э. Федоровой изучена роль генов, кодирующих семейство белков синаптотагминов. Показано, что вектор переноса везикул определяется напряжением цитоплазматической и симбиосомной мембран. Рост колонии микроорганизмов (инфекционной нити или симбиосомы) создаёт давление, которое запускает накопление синаптотагминов на мембране в месте входа бактерий. Это приводит к изменению направления трафика мембранных везикул, обеспечивая быстрый рост инфекционной нити, бесстенных капель и симбиосомной мембраны. При этом было показано, что один из синаптотагминов локализован непосредственно на симбиосомной мембране.

Е. Э. Федоровой также исследованы молекулярные механизмы модификации цитоскелета. Впервые показано, что формирование мембран симбиосом обеспечивается активными изменениями актинового цитоскелета, опосредованного генами и белками комплекса Arp2/3. При нокауте генов Arp2/3 рост симбиосом и азотфиксация почти полностью блокируется.

Для выяснения причин ускоренного старения клубеньков и их чувствительности к солевому стрессу в симбиосомах, вакуолях и цитоплазме инфицированных и неинфицированных клеток был проведен сравнительный

анализ уровня ионов K^+ и Na^+ , распределение ионных каналов AKT1, SKOR и GORK, а также экспрессия ряда генов, кодирующих $K^+/Na^+/H^+$ -антипортеры: MtNHX1, MtNHX6, MtNHX7, MtNHX7-like и MtNHX8. Обнаружено, что в инфицированных клетках калий теряется как симбиосомами, так и вакуолями, в отличие от неинфицированных. При этом оказалось, что белки-транспортёры MtAKT1 и MtSKOR/GORK не выявляются в цитоплазматической мембране, а накапливаются в молодых вакуолях.

Е. Э. Федоровой впервые установлено, что высокая чувствительность корневых клубеньков к солевому стрессу обусловлена нарушением механизмов выведения ионов Na^+ , что приводит к накоплению натрия в инфицированных клетках в количестве, в 5 раз превышающем его уровень в неинфицированных. Этот дефект обусловлен утратой белков MtNHX6 (обеспечивает накопление Na^+ в эндосомах) и MtNHX7 (обеспечивает выведение Na^+ в апопласт через плазматическую мембрану). Нарушение ионного гомеостаза в инфицированных клетках, вероятно, способствует более быстрому старению не только самих этих клеток, но и всего клубенька по сравнению с неинфицированными клетками корня. Таким образом, поддержание колонии азотфиксирующих бактерий снижает жизнеспособность и стрессоустойчивость клеток растения-хозяина.

Новизна исследований. Цель и задачи диссертационной работы Е.Э. Федоровой охватывают широкий круг нерешенных проблем, связанных с механизмами модификации эндомембранной системы инфицированной клетки, поддерживающими колонию азотфиксирующих бактерий.

В исследовании Елены Эриковны впервые установлено, что в процессе инфицирования мембраны симбиосом не приобретают маркеров эндоцитоза, что, по-видимому, предотвращает их немедленный лизис. Этому способствует также репрессия генов *VPS11* и *VPS15* вакуолярного комплекса HOPS, регулирующего везикулярный транспорт и слияние с мембраной тонопласта. Впервые показано также, что необходимым компонентом симбиотических отношений являются белки VAMP71, которые участвуют в образовании симбиосом и везикулярном транспорте сигнальных молекул.

Е.Э. Федоровой впервые установлено, что вектор везикулярного транспорта определяется напряжением цитоплазматической и симбиосомной мембран, которое создается инфекционной питью или симбиосомами, и регулируется синаптотактинами. Детально изучены модификации актинового цитоскелета в процессе развития симбиоза, опосредованные белками комплекса Arp2/3.

Е.Э. Федоровой впервые показано, что высокая чувствительность корневых клубеньков к солевому стрессу обусловлена нарушением механизмов выведения ионов Na^+ из цитоплазмы. Впервые показано, что нарушение ионного гомеостаза в инфицированных клетках ускоряет их старение, снижает жизнеспособность и стрессоустойчивость в отличие от неинфицированных.

Релевантность результатов и обоснованность выводов. Для выполнения поставленных задач Е. Э. Федорова использовала самые современные молекулярно-биологические и микроскопические методические подходы, а также методы иммуноцитохимии и энзимологии. Основные результаты работы опубликованы в высокорейтинговых журналах (Science, Plant Physiology, The Plant Cell, New Phytologist, Current Opinion in Plant Biology, Journal of Experimental Botany, The Plant Journal, Frontiers in Plant Science) и апробированы на международных и всероссийских конференциях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Е. Э. Федоровой проведен детальный анализ процессов формирования и морфологических изменений симбиосом в ходе развития симбиоза. Особое внимание уделено процессам новообразования и поддержания эндомембранной системы клеток корневого клубенька, основным белкам-маркерам эндомембран, специфике мембранного транспорта и секреции, а также участникам симбиотического интерфейса. Полученные в ходе исследования результаты предоставляют хорошую научную основу для целенаправленного генетического редактирования генов, регулирующих взаимодействие азотфиксирующих бактерий с инфицированной эукариотической клеткой. Раскрытие молекулярных механизмов адаптации клетки-хозяина к бактериальной колонии,

локализованной в симпласте, создаёт предпосылки для разработки искусственных биосистем, способных эффективно фиксировать атмосферный азот.

Вопросы, замечания и пожелания.

1. Вызывает удивление нестандартное структурирование главы «Обзор литературы», которая включает 24 разрозненных и логически не всегда связанных между собой раздела. Аналогичным образом построена глава «Результаты и их обсуждение», состоящая из 13 разрозненных разделов. Возникает вопрос: в чем заключается мотивация соискателя, построившего вышеуказанные главы диссертации не по традиционному плану?
2. Известно, что каналы SKOR и GORK обычно имеют четко разделенные функции, кодируются разными генами, расположенными (у арабидопсиса) на разных хромосомах. SKOR — это канал для загрузки калия в ксилему, а GORK обеспечивает выход калия из клеток устьиц и т.о. принимает участие в их закрывании. Вопрос: почему для иммулокализации использовались антитела к обоим белкам SKOR/GORK?
3. Белки синаптоагмины выполняют значительно больше уникальных для растений функций, чем сказано в диссертации (транспорт липидов, репарация поврежденных мембран, устойчивость к холоду и засолению). Поэтому стоило подробнее рассмотреть их участие в модификациях эндомембранной системы инфицированных клеток, а также их устойчивости к засолению и сделать соответствующие выводы в диссертационной работе.
4. На страницах 173–176 представлен, по всей видимости, черновик раздела «Заключение», окончательный вариант которого размещён на страницах 176–183.
5. Название раздела 1.21, который занимает всего 0.5 страницы, не соответствует содержанию.

6. Результаты, приведенные на рис. 6, 10, 26, 33 и 43 воспринимаются с трудом из-за нечетких подписей и обозначений.
7. Не расшифрованы аббревиатуры многих химических соединений, генов и белков, что усложняет анализ работы.
8. В тексте встречаются опечатки и неудачные выражения: «Группа прокариотических микроорганизмов, способных к азотфиксации, включает в себя различные *синезеленые водоросли*» (стр. 17); «*Катионные каналы, DM11...* были определены как *гены* ...» (Стр. 22); «...*в симпласте ... клетки*» (стр. 33, 39, 73); «...*другие гены, связанные со старением, такие как транскрипционные факторы...*» (стр. 51).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Е. Э. Федоровой выполнена на высоком методологическом и научном уровне и представляет собой законченное и самостоятельное исследование. Результаты работы достоверны, а сделанные на их основе выводы соответствуют поставленным задачам. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Общее заключение. Диссертация Е.Э. Федоровой «Эндоплазматическая система клеток корневого клубенька бобовых растений в условиях азотфиксирующего симбиоза» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений по направления исследований «Онтогенетические программы роста и морфогенеза растений» и «Сигнальные системы клеток и целых растений, рецепция и трансдукция внутренних и внешних сигналов», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Федорова Елена Эриковна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности «1.5.21 Физиология и биохимия растений».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Медведев Сергей Семенович

Контактные данные:

тел.: , e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 1.5.21.- физиология и биохимия растений.

Адрес места работы: 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», биологический факультет, кафедра физиологии и биохимии растений.

Тел.: e-mail:

06.04.2016