

В диссертационный Совет Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский Центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»,

Отзыв официального оппонента на диссертацию Коврижных В.В. **«КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСПОРТЕРОВ АУКСИНА СЕМЕЙСТВА PIN В КОРНЕ ARABIDOPSIS THALIANA L.»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Математическая биология, биоинформатика» 03.01.09.

Представленная диссертация машинописная рукопись на 102 страницах, с 22 рисунками и 8 таблицами. Список литературы составляет 108 названий в основном на английском языке.

Диссертация посвящена изучению тонких механизмов регуляции роста и морфогенеза корня ауксинами с помощью современных методов, включающих выявление областей экспрессии отдельных генов, гистохимии, сравнения мутантов и математического моделирования. Эти исследования являются весьма актуальными и широко проводятся в мире. Полученные результаты на высоком уровне, о чем в частности свидетельствует публикация результатов этой работы в очень авторитетном международном журнале. Хотя

исследований в этом направлении проводится много и в разных странах, работа является очень оригинальной, так как значительная ее часть посвящена моделированию распределения и активности ИУК в клетках корней с помощью методов, которые были предложены в Институте цитологии и генетики и успешно развиваются руководителем работы В.В.Мироновой. Оригинальность и актуальность этой работы в большом потоке работ, посвященных изучению ауксинов, которые проводятся во всем мире, состоит в том, что в ней осуществлены комплексные исследования с помощью широкого круга методов, на большом числе мутантов и трансгенов с применением самых современных методов компьютерного анализа изображений и математического моделирования. Другими исследователями такой комплексный подход не использовался.

Ключевое значение ауксинов в регуляции роста и морфогенеза растений определяет фундаментальное значение раскрытия механизмов транспорта ауксинов, чему посвящена диссертация, одной из важнейших проблем биологии развития растений и с решением этой проблемы будет иметь решающее значение для понимания очень большого круга проблем физиологии и биологии развития растений.

Диссертация построена по обычному плану и состоит из введения, обзора литературы, двух глав, посвященных изложению описанию материала, методов и полученных результатов, заключения и выводов.

В литературном обзоре дан достаточно полный обзор литературы, в котором кратко описано анатомическое строение корня и меристемы

арабидопсиса, механизма действия. Рассмотрены современные данные о механизмы действия ауксина, его метаболизма и транспорта. Подробно описано распределение ауксинов в меристеме корня. Особое внимание уделено всесторонней характеристике PIN белков, их распределения и синтеза. Описан компьютерный анализ изображений с конфокального микроскопа. Наконец, дано представление о математическом моделировании пространственного распределения морфогенов и математическое моделирование динамики распределения ауксина PIN транспортерами. В целом обзор достаточно полный для кандидатской диссертации подготавливает читателя к анализу основного материала.

Оригинальность работы состоит в том, что значительная часть экспериментальной работы была проведена Т.Пастернак в университете Фрейбурга, а диссертант анализировал компьютерные фотографии. Мне в этой части не хватало описания фенотипов мутантов и в особенности описания роста корней мутантов, деления и растяжения клеток в корнях. Это позволило бы связать выявленные особенности распределения PIN с ростом и делением клеток, так как ИУК является важным компонентом их регуляции. Перейдем к анализу результатов работы. Прежде всего, было дано детальное описание паттернов экспрессии PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 в корне растений *A. thaliana Col-0*. Для составления такой карты был проведен анализ 2D изображений корней *A. thaliana*, полученных с помощью конфокального микроскопа, в которых экспрессия исследуемых PIN белков была визуализирована с помощью

одновременного мечения двух PIN белков в различных комбинациях и в трансгенных линиях PIN::PIN-GFP. В таком большом объеме эти данные были получены впервые. В результате их составлены четкие карты распределения и экспрессии разных PIN по длине корня и разным тканям. Анализ 3D изображений с иммулокализацией PIN1 позволил показать распределение его экспрессии в тканях. Кроме того, были впервые получены картины распределения экспрессии этого белка в боковых корнях и гипокотиле.

В дальнейших экспериментах была проанализирована роль ИУК в регуляции экспрессии PIN белков. Анализ литературных данных по распределению ИУК в меристеме и сопоставление с результатами полученными автором при изучения распределения разных PIN показал, что клетки с разной внутриклеточной концентрацией ауксина имеют разную полярную локализацию PIN. Эти различия установлены впервые.

Четко показано, что после обработки корней ауксином экзогенно каждый из PIN белков увеличивал домен и интенсивность своей экспрессии, но максимальный эффект для каждого PIN наблюдался при разных дозах ауксина. Количественный анализ интенсивности экспрессии PIN белков в ответ на экзогенный ауксин подтвердили предположение о том, что разные PIN белки чувствительны к разным дозам ауксина. Эти данные были подтверждены при изучении мутанта с повышенным содержанием ауксина.

Вся совокупность полученных данных позволила сформулировать гипотезу о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии своих белков-транспортеров семейства PIN и их полярной локализации. Это выражено в разной степени для разных PIN. Несомненно, что формулировка и обоснование такой гипотезы, имеющей очевидное важное значение для понимания механизмов действия ИУК, является существенным достижением диссертанта.

Третья глава посвящена изучению процессов самоорганизации паттернов распределения ауксина и его PIN-транспортеров в меристеме корня *A. thaliana* методами математического моделирования. В этих исследованиях была использована модель, разработанная руководителем диссертанта В.В.Мироновой с соавторами и ряд других моделей, разработанных в ИнЦиГ. Модель была детально разобрана. Очень существенно, что подробно проанализирована устойчивость результатов к изменению разных параметров. Проведенные исследования показали хорошее совпадение результатов модели и экспериментальных данных. Таким образом, с помощью моделирования была подтверждена гипотеза о дозозависимой регуляции ИУК, высказанная ранее в литературе, и детально подтвержденная в рецензируемой диссертации. Это является важным результатом, получившим признание.

Таким образом, в диссертации получены новые и оригинальные результаты, в результате использования современных методов анализа изображений и совместной работе с зарубежными исследователями. Диссертация в основном четко написана и можно сделать только некоторые несущественные замечания. Нет четкого разграничения

между понятиями «доза» и «концентрация». Ясно, что у них разным размерность и в ряде случаев, когда говорится о «дозовой» на самом деле правильно, на мой взгляд, говорить о «концентрационной» зависимости. Нет четкости в изложении анатомии корня. Неясно, например, что такое «сосудистая ткань», которая состоит из принципиально разных во многих отношениях флоэмы и ксилемы. Как-то пропадает паренхима центрального цилиндра. Однако это не снижает ценности рецензируемой диссертации.

Несомненно, что в ней решена актуальная задача в области биоинформатики, биологии развития и физиологии растений - выяснена регуляция экспрессии и распределения транспортеров ИУК самой ИУК, что важно для понимания многих проблем. Это получено с помощью современных методов компьютерного анализа конфокальных изображений, использования широкого набора трансгенов и мутантов и математического моделирования. Результаты опубликованы в ведущих журналах, включая международный, и доложен на конференциях. На основании вышеизложенного считаю, что диссертация удовлетворяет всем требованиям ВАКа к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, и В.В. Коврижных достойна искомой степени.

Официальный оппонент

Профессор, доктор биол. наук

В.Б.Иванов

Сведения об оппоненте

ПОДПИСЬ
ЗАБЕРЯТЬ
ЗАВ. ОТД. КАДРОВ

Иванов Виктор Борисович докт биол наук (физиология и биохимия растений, 03.01.05), профессор, ведущий научный сотрудник
Лаборатории физиологии корня, Института физиологии растений им.
К.А.Тимирязева РАН. Москва, 127276, Ботаническая улица 35.
Тел 8-499-231-83-04, ivanov_vb@mail.ru