

Отзыв официального оппонента к.б.н. Тютеревой Е.В.  
на диссертацию Анохиной Галины Борисовны  
«Анализ механизмов действия стрессовых факторов на функционирование ферментов  
метаболизма 2-оксоглутарата в листьях кукурузы»  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по двум специальностям: 1.5.4 – Биохимия и 1.5.21 – Физиология и биохимия растений,  
представленную к защите 6 октября 2022 г. в диссертационном совете 24.2.288.02  
на базе Воронежского государственного университета  
по адресу 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, 1.

Диссертация посвящена изучению регуляции трех ферментов метаболизма важнейшего соединения растительной клетки 2-оксоглутарата – 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (2ОГДК), глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и оксидитратдегидратазы декарбоксилирующей (ОД) в фотосинтезирующих клетках листьев кукурузы под действием двух важнейших стрессовых факторов – солевого стресса и гипоксии, а также исследованию световой регуляции активности и экспрессии ферментов под действием низкоинтенсивного света различного спектрального состава при нормальных условиях среды.

2-оксоглутарат или  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота (2ОГ) – один из ключевых метаболитов клетки, регуляция потока которого критически необходима для осуществления клеточного дыхания и поддержания высокого энергетического статуса клетки как в нормальных условиях, так и при адаптации к неблагоприятным факторам среды. Прежде всего, эта органическая кислота является интермедиатом цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), одного из важнейших энергообразующих путей метаболизма клетки. 2-оксоглутарат играет также основную роль в первичном связывании аммиака в качестве углеродного скелета для построения глутамата путем ферментативной реакции с участием глутаматдегидрогеназы или в глутамин-синтезном пути. Таким образом, 2-оксоглутарат является уникальным по значимости соединением, участвующим в биохимических реакциях на пересечении углеродного и азотного метаболизма. Исследуется также и возможная роль 2ОГ в качестве метаболического сигнала, регулирующего баланс между углеродным и азотным путями метаболизма (по аналогии с той важной ролью 2ОГ, которую он играет в соединении с пластидным белком РII у растений). 2ОГ является прямым регулятором ферментов, таких, например, как цитозольная пируваткиназа, фосфоенопируваткарбоксилаза, митохондриальная цитратсинтаза и альтернативная оксидаза, выполняющих важную роль в метаболизме сахаров и органических кислот, а также редокс контроле состояния цитозоля и митохондрий.

Метаболические потоки 2-оксоглутарата чрезвычайно сложны для изучения, в том числе в связи с высокой скоростью взаимопревращений этого соединения сразу в нескольких метаболических путях. Основной сайт образования этого метаболита в растительной клетке и по сей день остается дискуссионным. В особенности комплексными и недостаточно изученными остаются обмен метаболитами между цитоплазмой, митохондриями и хлоропластами на свету, а также регуляция интенсивности ЦТК на свету и в темноте. Безусловно диссертационная работа Анохиной Галины Борисовны вносит



существенный вклад в изучение этих вопросов. Таким образом, данное исследование обладает **высокой актуальностью** и лежит в русле современной проблематики адаптации дыхательного углеродного и азотного метаболизма высших растений к важнейшим абиотическим стрессорам и сигнальной регуляции работы ферментов в связи с изменением спектрального состава света.

**Целью работы** являлось изучение физиолого-биохимических аспектов ферментативной регуляции метаболизма 2-оксоглутарата в листьях некоторых растений С3 и С4 типа в условиях солевого стресса, гипоксии, а также при облучении светом различного спектрального состава. В работе были поставлены и решались четыре задачи: 1) Изучить субклеточную локализацию энзимов, метаболизирующих 2-оксоглутаровую кислоту, а также изменения их изоферментного состава в стрессовых условиях; 2) Получить высокоочищенные препараты ГДГ из С3 (*Triticum aestivum* L.) и С4 (*Zea mays* L.) растений и провести сравнительный анализ некоторых кинетических характеристик полученных белков; 3) Исследовать биохимические и физиологические аспекты функционирования 2ОГДК, ГДГ, ОД в растениях (*Zea mays* L., *Beta vulgaris* L., *Arabidopsis thaliana* L.) *in vivo* в условиях действия солевого стресса, гипоксии и при облучении светом различного спектрального состава; 4) Выявить роль процесса метилирования CpG-динуклеотидов промотора в регуляции транскрипции генов, кодирующих 2ОГДГ, ГДГ, ОД в условиях действия различных стрессовых факторов.

Представленная диссертационная работа характеризуется **высокой научной новизной**. В работе впервые показаны многие чрезвычайно важные механизмы регуляции активности ферментов метаболизма 2ОГ у растений, участвующие в адаптации клеточного метаболизма в условиях нескольких типов абиотического стресса, а также сигнальные пути, задействованные в транскрипционном контроле уровня биосинтеза ферментов метаболизма 2ОГ при различном спектральном составе света. Из них следует особенно отметить следующие: 1) Показано, что в листьях проростков кукурузы в условиях солевого стресса изменения состояния метаболического путей с участием 2ОГ-метаболизирующих ферментов происходит взаимосвязанно и в два последовательных этапа: кратковременная активация 2ОГДК и ОД при продолжительном, более чем 6 часовом солевом стрессе сменяется их ингибированием с включением компенсаторного ГАМК-шунта; 2) Обнаружено, что в условиях гипоксии происходит ингибирование 2ОГДК с одновременным усилением аминирующей активности ГДГ, активацией ГАМК-шунта и активацией оксидитратдегидратазы и, соответственно, синтеза 2ОГ в хлоропластах; 3) Проанализированы последовательности промоторных областей генов, кодирующих важнейшие ферменты метаболизма 2ОГ и показано участие эпигенетической регуляции их экспрессии путем изменения метильного статуса CpG-динуклеотидов; 4) С помощью классических биохимических методов субклеточного фракционирования и анализа ферментативной активности подтверждена хлоропластная локализация оксидитратдегидратазы; 5) Показано участие фитохромной и криптохромной систем в передаче светового сигнала о спектральном составе света на изученные ферменты цикла трикарбоновых кислот и ассимиляции азота, метаболизирующие 2ОГ.

Диссертационная работа отличается **высокой теоретической значимостью** и оригинальностью, поскольку большинство данных получено автором впервые. Результаты проведенных исследований могут быть использованы при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии растений, биохимии и общей биологии; адаптированные методики



выделения, очистки и определения активности ферментов имеют высокую ценность для **практического использования** как в фундаментальных, так и в прикладных разработках.

Диссертационная работа включает список сокращений, введение, три главы (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение), заключение, выводы, список цитируемой литературы, включающий 203 источника (из них 182 на английском языке) и приложения с иллюстрациями (диаграммами, графиками, рисунками и схемами) на 31 страницу. Диссертация изложена на 169 страницах основного текста, иллюстрирована 74 рисунками и 14 таблицами.

Во «Введении» лаконично очерчена проблематика приспособления растительных организмов к действию абиотических стрессоров и важности регуляции работы ферментов ключевых метаболических путей как одного из механизмов адаптации к изменяющимся условиям среды. Описаны основные метаболические пути дыхания растительной клетки и роль митохондрий в этом катаболическом пути. Приведена краткая информация о трех ферментах метаболизма 2ОГ, регуляция активности которых изучена в исследовании диссертанта. В целом следует отметить, что во введении диссертантом обоснована актуальность проведения исследований особенностей функционирования 2ОГДК, ГДГ и ОД, принимающих участие в метаболизме 2-оксоглутаровой кислоты в стрессовых условиях. Цель работы посвящена изучению нового явления, сформулирована четко. Задачи представляют собой ясный план исследования из 4-х основных блоков экспериментов, направленный на достижение поставленной цели. Диссертантом проведена оценка научной новизны, теоретической и практической значимости проведенного исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, приведена информация об апробации работы в виде представления результатов на общероссийских и международных конференциях, а также сведения о публикациях по теме диссертации, структуре и объеме диссертационной работы. Из недостатков «Введения» можно отметить отсутствие постановки проблемы взаимосвязи ферментативной активности или изоферментного состава и типа ассимиляции углерода в фотосинтезе по С3 или С4 типу, а также информации о метилировании нуклеотидов как одного из важнейших регуляторных факторов метаболизма, в частности, уровня транскрипции апоферментов.

В Главе 1 (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) представлены современные данные о структуре и функционировании ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ (раздел 1.1.), и роли 2ОГ в адаптации метаболизма к действию стрессовых факторов (раздел 1.2.).

В первой части обзора (раздел 1.1.) диссертантом тщательно собрана и проанализирована информация по структурно-функциональной характеристике 2ОГДК, ГДГ и ОД. Описаны три компонента мультиферментного комплекса Е1-Е3, участника цикла трикарбоновых кислот – 2ОГДК, катализирующего лимитирующий этап митохондриального дыхания и, одновременно, являющийся ключевым участником в углерод-азотных взаимодействиях (подраздел 1.1.1.). Приведены сведения о локализации, белковом составе, кофакторах и биохимической регуляции каталитической активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы (2-ОГДГ), дигидролипоамидсукцинилтрансферазы (ДЛСТ) и дигидролипоамиддегидрогеназы (ДЛД) в клетках растений. В обзоре собрана важная информация о количестве аннотированных генов, кодирующих три компонента 2ОГДК, в геномах арабидопсис *Arabidopsis thaliana* L. и кукурузы *Zea mays* L. и регуляции генов 2ОГДК. В разделе 1.1.2 описан белковый субъединичный состав, кинетические свойства, эффекторная регуляция активности и изоферментный состав глутаматдегидрогеназы (ГДГ)



в клетках растений, а также кодирующие фермент гены и существующие на сегодняшний день представления о физиологической роли этого фермента в регуляции гомеостаза глутамата в точке разветвления путей ассимиляции азота и углерода. В разделе 1.1.3. приведена информация о слабо изученном на сегодняшний день метаболизме оксидитрата у растений. Описана структура фермента оксидитратдегидратазы (ОД), отвечающего за превращение оксидитрата в 2ОГ, что имеет важное значение в качестве источника 2ОГ в случае критической необходимости в этом субстрате для энергетического метаболизма. Приведены сведения о кодирующих ОД генах, аннотированных в геномах арабидопсиса и кукурузы. Следует отметить, что диссертант грамотно собрал и использовал информацию об эволюции структуры и функции ферментов у различных бактериальных и животных организмов, что позволило выдвинуть предположения о возможном направлении поисковых работ в изучении метаболизма 2ОГ у растений, придало дополнительную глубину анализа современного состояния проблемы и предмета исследования.

Вторая часть обзора литературы (раздел 1.2.) посвящена действию стрессовых факторов на клеточный метаболизм с акцентом на роли 2ОГ в адаптации растительной клетки. Формулируется понятие стресса у растений как единой ответной реакции организма на повреждающее воздействие, которая обеспечивает выживание организма путём активации всех защитных систем организма. Кратко, но информативно описан ГАМК-шунт, представляющий собой метаболический путь  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, и его роль в поддержании реакций ЦТК в условиях стресса.

В подразделе 1.2.1.1. изложены общие представления о солевом стрессе, фазах его развития, причинах токсического действия хлорида натрия. Диссертантом описана сложная сеть сигнальных взаимодействий метаболитов, включая кальций/кальмодулин-центрированную систему передачи сигнала развития солевого стресса, SOS-путь контроля ионного гомеостаза и участие АБК в передаче сигнала осмотической компоненты стресса. Уделено внимание роли осмолитов (пролина и растворимых сахаров, аминокислот) в адаптации метаболизма к засолению, а также глутаматному пути биосинтеза пролина. Приведены сведения об изменении субъединичного состава ГДГ при засолении в сторону преимущественного биосинтеза  $\alpha$ -субъединицы, отвечающей за аминирование 2ОГ. Описано неоднозначное действие солевого стресса на разные виды растений, пшеницы и тополя, поскольку ингибирование активности 2ОГДК, торможение ЦТК и повышение активности ГАМК шунта наблюдалось у пшеницы, но не было показано для тополя.

Подраздел 1.2.1.2. посвящен влиянию светового режима на метаболизм растений. Приведена краткая информация об известных семействах фоторецепторов высших растений, которые могут улавливать свет в диапазоне от УФ-В излучения до дальнего красного света. Отмечено, что физиологическая реакция растения на изменение светового режима, как правило, обеспечивается действием нескольких фоторецепторов, причем сигнальные пути разных фоторецепторов могут быть скоординированы или конкурировать друг с другом. Описаны изменения активности ферментов цикла трикарбоновых кислот, в том числе 2-ОГДК, при выращивании растений при различном спектральном составе света, а также функциональные изменения ЦТК и ГАМК шунта, которые происходят в результате смены режима темнота/свет и изменений спектрального состава света.

Современные сведения о влиянии стресса гипоксии на биоэнергетику и углеродный метаболизм растительной клетки приведены диссертантом в разделе 1.2.1.3. Описаны важнейшие изменения дыхательных путей в растительной клетке в условиях гипоксии и



аноксии, ингибирующее влияние недостатка кислорода на окислительное фосфорилирование в ЭТЦ митохондрий и усиление активности гликолиза, а также активация обходных путей подачи сукцината и оксалоацетата в ЦТК в обход инактивированных ферментов, в частности, с участием ГАМК-шунтирующих реакций. Приведена информация о нескольких теоретически возможных путях метаболизации 2ОГ и оценка вероятности уровня их активации в условиях гипоксии на основе немногочисленных известных в литературе экспериментальных исследований.

В целом обзор литературы информативен, логично изложен и проиллюстрирован тремя рисунками, два из которых являются оригинальными, выполненными автором диссертации. Общее положительное впечатление от ознакомления с обзором оказывается немного омрачено многословностью и смысловыми повторами по тексту, которые встречаются даже в пределах одного и того же раздела.

В качестве недостатков Главы «Обзор литературы» можно отметить следующее: 1) Следовало бы выделить отдельный раздел или подраздел, посвященный роли 2ОГ в азотном метаболизме растений и вкладу митохондриального фермента ГДГ и цитозольно-хлоропластной ферментной системы ГС/ГОГАТ в контроле гомеостаза глутамата у растений; 2) Следовало бы также выделить раздел о всех известных на сегодняшний день источниках образования 2ОГ, путях транспорта 2ОГ и его перераспределении между компартментами клетки, а также создать обобщенную схему путей, в которых это соединение выступает в качестве субстрата или регулятора, причем рассмотреть его метаболизм как на свету в условиях подавления ЦТК, так и в темноте при активации ЦТК; 3) Влияние светового фактора на метаболизм растений логичнее было бы вынести из раздела Обзора, посвященного стрессорам, поскольку изложен материал не о стрессирующих для растений интенсивностях света, а об изменении активности ферментов при изменении режима условий темнота/свет и регуляторной роли низкоинтенсивного узкополосного красного, дальнего красного и синего света в фотоморфогенезе; 4) В Обзоре отсутствует раздел, посвященный механизмам регуляции ферментов у растений, в частности, эпигенетическим механизмам регуляции активности ферментов дыхательного метаболизма и ассимиляции азота, которые представляются крайне важными для постановки задачи №4, состоящей в изучении роли метилирования в регуляции транскрипции генов, кодирующих ферменты метаболизма 2ОГ, и обсуждении огромного массива экспериментальных данных диссертанта, полученных при решении этой задачи; 5) Обзор литературы следовало бы завершить кратким обобщением изложенной информации с акцентом на сложный комплексный характер регуляции метаболического потока 2ОГ и участие ферментов его метаболизма в углеродном и азотном обмене веществ растений кукурузы в нормальных и стрессовых условиях роста.

В Главе 2 (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ) приведена информация о цели и задачах исследования (раздел 2.1.), объектах исследования и описан широкий спектр биохимических и молекулярно-биологических методов, использовавшихся в работе (раздел 2.2.). Объекты исследования описаны с указанием видового названия, сортовой принадлежности и обозначением генотипа, а также возраста проростков. Для каждого метода приведены корректные ссылки на оригинальные методические статьи, указаны температурные и временные условия проведения экспериментов. Недоработка автора диссертации состоит в недостаточной полноте описания используемых методик. Так, например, 1) не приведен состав среды для гидропонного выращивания основного объекта



кукурузы; не указано на каком субстрате выращивались проростки других видов растений; 2) метод получения мутантов арабидопсис по фоторецепторам и характеристика (локализация в геноме) мутаций; 3) не указан спектральный состав белого света, который выступал в качестве контроля в экспериментах по изучению влияния света различных длин волн; 4) в подразделах, описывающих выделение энзимов, часто указывается величина скорости центрифугирования в оборотах в минуту без указания радиуса используемого ротора, что делает невозможным воспроизведение методики в других лабораториях с использованием другого оборудования; корректнее было бы привести точные условия центрифугирования в RCF в единицах тяжести (временная гравитация или g); 5) некоторые реактивы в протоколах обозначены без указания фирмы-производителя, как например, ТДФ, ФМС, ПВП-40, ДТТ, СДС, ЦТАБ, а аббревиатуры некоторых реактивов и соединений не расшифрованы в «Списке сокращений», например, ТЕМЕД, CoA-SH; 6) не указано каким типом фильтрующего материала пользовались и при выделении общей клеточной фракции ферментов и выделении митохондрий и каков требуемый для эффективной фильтрации размер пор; 7) онлайн протокол для расчета концентрации ДНК в образце не является надежным источником информации, поскольку онлайн сервис может быть перемещен или удален, поэтому следует приводить в публикации либо ссылку на оригинальную статью, либо непосредственно формулы расчета; 8) Сложный и многоэтапный процесс определения паттерна метилирования ДНК, а именно анализ промоторной области генов на наличие CpG-островков, описан в виде нескольких разрозненных подразделов, из которых неочевидна ни последовательность их выполнения, ни результат, который достигается на каждом из этапов – пункты 2.2.2.20-2.2.2.22. К сожалению, в данных подпунктах отсутствует ссылка на методическую статью, по которой можно было бы уточнить особенности метода. В целом совершенно очевидно, что автор потратил немало сил и времени на адаптацию большого количества методов под задачи проведенного исследования, выполненного на разнообразном растительном материале кукурузы, пшеницы, свеклы и арабидопсиса, но по непонятной причине не посчитал нужным изложить детали, которые могли бы быть чрезвычайно полезными для исследователей следующих поколений.

Экспериментальная часть работы (Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ, вследствие опечатки обозначенная в Оглавлении как Глава II) состоит из трех разделов (1., 2., 3.), посвященных влиянию солевого стресса, света различного спектрального состава и гипоксии на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ.

В *первом разделе* автором приведены результаты обработки отделенных побегов кукурузы (надземных частей без корневой системы) 150 мМ хлоридом натрия. Развитие солевого стресса показано по накоплению пролина. Описаны и проанализированы эффекты кратковременного воздействия раствора хлорида натрия продолжительностью до 6 ч и долговременного засоления более 6 ч. Показано, что в листьях растений кукурузы 2ОГДК локализован в митохондриальной фракции, выявлена единственная изоформа фермента. Проведен сравнительный анализ изменений активности у С3 и С4 растений на примере кукурузы и сахарной свеклы. Обнаружен сходный эффект в первые несколько часов инкубации – увеличение каталитической активности 2ОГДК. При этом показано различие в продолжительности поддержания высокой активности 2ОГДК и ЦТК на фоне солевого стресса – у представителя С3 растений в отличие от С4 растений высокие значения ферментативной активности сохранялись не только до, но и после 12 ч инкубации. Автором



получены интригующие результаты, но обсуждение, каким образом путь ассимиляции углерода в фотосинтезе и анатомо-физиологические различия могут быть связаны с активностью ЦТК, не проведено. Изучена динамика транскрипционной активности генов, кодирующих три фермента 2ОГДК, в листьях кукурузы и свеклы. Показана корреляция относительного уровня транскриптов генов *OGDH-1*, кодирующих 2ОГДГ, с изменением общей ферментативной активности 2ОГДК у обоих типов растений. Обнаружена кратковременный характер индукции экспрессии *OGDH-3* у кукурузы. Оказалось, что изменение уровня мРНК гена *OGDH-1* кукурузы при воздействии засоления сопряжено с изменением метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в составе промотора. Показана роль метилирования ДНК в регуляции уровня экспрессии генов *OGDH-1* и *OGDH-3*. На фоне солевого стресса описан кратковременный эффект повышения экспрессии генов *DLST-1*, кодирующих фермент ДЛСТ как у кукурузы, так и у сахарной свеклы. На проростках кукурузы показано, что индукция экспрессии гена *DLST-2* происходит позже, чем *DLST-1*. В ответ на засоление у кукурузы происходило также быстрое и значительное увеличение экспрессии генов *DLD-1* и *DLD-2*, кодирующих компонент Е3 дигидролипоамиддегидрогеназу. Таким образом, интенсификация ферментативной активности 2ОГДК под воздействием солевого стресса непротиворечиво подтверждена усилением транскрипции генов трех входящих в его состав энзимов. Усиление транскрипции коррелировало с изменением метильного статуса CpG-динуклеотидов, по крайней мере, одного из компонентов этого мультиферментного комплекса – 2ОГДГ.

Подтверждена локализация ГДГ преимущественно в митохондриях и, в меньшей степени в цитозоле клеток кукурузы, что соответствует данным других авторов. Получены очищенные препараты ГДГ из листьев кукурузы и проростков пшеницы, проведен анализ рН оптимумов работы и сродства полученных ферментных препаратов к субстратам. На фоне солевого стресса в листьях кукурузы установлено повышение общей ферментативной активности ГДГ и появление дополнительной изоформы глутаматдегидрогеназы, что коррелировало с усилением экспрессии кодирующих этот фермент генов *GDH-1* и *GDH-2*. Экспрессия *GDH-1* и *GDH-2* изменялась попеременно – сначала при засолении усиливалась транскрипция *GDH-2*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу ГДГ, катализирующей образование 2ОГ (до 6 ч засоления), что способствует поддержанию ЦТК и всего энергетического метаболизма. При продолжительном засолении в течение 6 ч и более показано увеличение экспрессии гена *GDH-1*, обеспечивающего формирование  $\beta$ -субъединиц ГДГ и, в итоге, синтез глутамата, пролина и ГАМК. Описан эпигенетический механизм регуляции транскрипции генов *GDH-1* и *GDH-2* за счёт изменения метильного статуса CpG-динуклеотидов в составе их промоторов. Кроме того показано, что солевой стресс усиливал транскрипцию одного из двух генов сукциниловой семиальдегиддегидрогеназы (ССАДГ), а именно *SSADH-1*, при одновременной репрессии транскрипции *SSADH-2*.

Показана преимущественная хлоропластная локализация изоферментов оксидитратдегидратазы, отвечающих за превращение оксидитрата в 2ОГ в листьях кукурузы, являющегося участником биосинтеза аминокислот с разветвленными боковыми цепями (остатками). Субклеточная локализация ферментативной активности ОД проведена впервые и подтверждает хлоропластную локализацию, которая ранее в литературе предполагалась только на основании функций фермента и кодирующей



последовательности генов *DHAD-1* и *DHAD-2*. На фоне засоления листьев кукурузы обнаружены изменения транскрипционной активности гена *DHAD-1*, которые коррелировали с изменениями общей ферментативной активности ОД, что говорит о вероятной роли данного гена в синтезе полипептида, ответственного за поставку 2ОГ в качестве субстрата для синтеза аминокислот с разветвленными боковыми цепями, или же как предшественника в биосинтезе первичной аминокислоты – глутамата. В то же время устойчивое повышение экспрессии гена *DHAD-2*, вероятно, свидетельствует об участии энзима в синтезе аминокислот с короткими боковыми цепями. Изучены особенности эпигенетической регуляции ОД: изменение степени метилирования показано только для промотора *DHAD-2*. Раздел завершается содержательным заключением (1.6.), описывающим изученные эффекты солевого стресса.

Во втором разделе изложены результаты экспериментов, направленных на изучение влияния света различного спектрального состава на функционирование ферментов 2ОГДГ, ГДГ и ОД на примере проростков кукурузы и растений арабидопсиса дикого типа, а также серии мутантов по генам фоторецепторов фитохромов (А, В) и одного из криптохромов (*cry-4*).

Во-первых, показана повышенная ферментативная активность 2ОГДК, суммарной фракции и, отдельно, митохондриальной фракций ГДГ, а также ОД при экспозиции листьев в темноте по сравнению с экспозицией на свету. К сожалению, из описания условий проведения экспериментов не совсем ясно, какова же была продолжительность экспозиции в темноте и на свету (группа «свет», находившаяся в обычных световых условиях), каковы были спектральные характеристика света и его интенсивность.

Во-вторых, на листьях кукурузы обнаружен фитохром-зависимый механизм регуляции ферментативной активности 2ОГДК – подавление белым и красным светом. При этом активная форма фитохрома, как следует из результатов проведенных экспериментов, проявляет ингибирующее действие по отношению к 2ОГДК. Изменения ферментативной активности 2ОГДК кукурузы коррелировали с изменениями в уровне экспрессии генов *OGDH-1* и *OGDH-3*. Для гена *OGDH-1* показан криптохром-зависимый механизм регуляции. Паттерн экспрессии генов, кодирующих 2ОГДГ в растениях арабидопсиса, изменялся сходным образом. Установлен также фитохромный контроль за уровнем активности глутаматдегидрогеназы и экспрессии кодирующих её генов *GDH-1* и *GDH-2*. В качестве одного из механизмов трансдукции фитохромного сигнала в ядро клетки диссертант предполагает участие ионов  $Ca^{2+}$  в качестве вторичного мессенджера, изменяющего уровень транскрипции генов ГДГ. Показано, что на свету увеличивалась транскрипция генов, кодирующих сукцинилую семиальдегиддегидрогеназу (ССАДГ), что обусловлено, вероятно, необходимостью поддерживать реакции ЦТК на свету, причем регуляция одного из двух кодирующих ССАДГ генов осуществлялась с участием фитохромов.

В-третьих, показана фитохром-зависимая регуляция работы оксидитратдегидратазы декарбоксилирующей. Установлено, с характером динамики общей ферментативной активности при разном спектральном составе света коррелировал паттерн экспрессии только одного из двух генов, кодирующих ОД, а именно *DHAD-1*.

В заключительном пункте второго раздела 2.5. автор проанализировал полученные данные и предложил информативную и ясную обобщенную гипотетическую схему регуляции активности ферментов метаболизма 2-оксоглутарата в листьях кукурузы при



смене светового режима и под действием света разного спектрального состава (Приложение, Рис.20).

*Третий раздел* Главы III посвящен описанию результатов экспериментальных работ по исследованию функции ферментов метаболизма 2ОГ в листьях кукурузы при гипоксии. Показано снижение ферментативной активности 2-ОГДК и коррелирующее с этим явлением снижения уровня экспрессии генов 2ОГДГ (*OGDH-1* и *OGDH-3*). Выявлено, что уменьшение экспрессии связано с увеличением степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов промоторов обоих кодирующих 2ОГДГ генов. В условиях гипоксии показана компенсаторная активация ферментной системы ГДГ по реакции аминирования. Выявлено разнонаправленное изменение уровня экспрессии двух генов, кодирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы ГДГ соответственно. Увеличение аминирующей активности ГДГ коррелировало с усилением экспрессии *GDH-1* и подавлением экспрессии *GDH-2*, в результате чего в условиях гипоксии происходит преимущественный биосинтез  $\beta$ -субъединиц, что обеспечивает в свою очередь синтез глутамата, пролина и ГАМК. Показано сопряжение степени метилирования CpG-динуклеотидов промоторов и активности генов ГДГ. В условиях недостатка кислорода описана индукция экспрессии *SSADH-1*, кодирующего фермент ССАДГ – участник реакций ГАМК-шунта.

Диссертант обоснованно предполагает, что снижение активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса с одновременным увеличением активности ГДГ и усилением экспрессии ССАДГ свидетельствует о «переключении» потока 2ОГ из ЦТК на образование глутамата, который в дальнейшем может быть использован клеткой непосредственно как в биосинтезе аминокислот, так и в качестве субстрата для ГАМК-шунта – одного из основных «стрессовых» путей дыхательного метаболизма в растительной клетке. Показано первичное ингибирование и последующая активация активности хлоропластной ОД в условиях гипоксии, усиление экспрессии кодирующих ОД генов, в особенности *DHAD-1*, которое коррелировало с изменением степени метилирования CpG-динуклеотидов в составе промоторной области гена. В то же время обнаруженные изменения в метильном статусе промотора гена *DHAD-2* признаны случайными и не связанными с регуляцией транскрипции данного гена при гипоксии. На основе полученных данных автором разработана оригинальная гипотетическая схема регуляции метаболизма 2ОГ в условиях недостатка кислорода (Приложение, рис. 19).

В разделе «ЗАКЛЮЧЕНИЕ» автором кратко изложены наиболее важные полученные данные и предложена гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов, метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы при действии солевого стресса. Схема является прекрасным обобщением полученных в работе результатов и позволяет рассмотреть изменения метаболических путей углеродного и азотного метаболизма с участием 2ОГ при развитии ответа на засоление в двух фазах: при кратковременном воздействии солевого стресса (до 6 ч инкубации с хлоридом натрия) и при долговременном засолении (более чем 6 часовом воздействии солевым раствором). Следует отметить, что схемы изменений метаболической сети построены автором и для регуляции функционирования ферментов, метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы при смене светового режима, а также в гипоксических условиях, но помещены в «Приложение» к основному тому диссертации в виде Рисунков 19 и 20, что, по-видимому, связано с большим объемом данных и текста диссертации.



Диссертационная работа при всей тщательности и высоком научном уровне выполнения не лишена некоторых недочетов в оформлении, таких как неполнота описания методов и погрешности в оформлении работы. Так, например, по тексту работы 2 раза излагаются цель и задачи исследования – во Введении (стр. 11-12) и в Главе II (стр.62); несмотря на проведенную статистическую обработку данных, обозначения достоверности отличий между средними величинами на графиках и столбчатых диаграммах отсутствуют; в «Списке сокращений» неверно расшифрованы сокращения «НАД+ – никотинамидадениндинуклеотид» и «НАДН – никотинамиддинуклеотид» – во-первых, оба соединения являются никотинамидадениндинуклеотидом, но только аббревиатурой «НАД+» обозначается его окисленная форма, а «НАДН» – восстановленная форма (стр. 8); в обзоре литературы утверждается, что клетки растений содержат четыре вида комплексов дегидрогеназ  $\alpha$ -кетокислот, а перечисляется только три наименования (стр. 16); не расшифрована аббревиатура АЛАТ, АСАТ, НАДФ-ИДГ, МС-ПЦР; упоминается явление «снижения частоты дыхания» у растений (стр. 55); на рисунках, иллюстрирующих статус метилирования промоторов генов, на дополнительной оси ординат не ясно указана степень метилирования суммарной выделенной ДНК или островков CpG динуклеотидов в %. Что такое %5mc ?; в подписи к Рис.19 (стр. 101) в условных обозначениях ошибочно указан цвет столбцов диаграммы, хотя на рисунке приведен график.

Изложение и интерпретация некоторых данных не вполне ясны, в связи с чем хотелось бы уточнить у автора следующие моменты:

1. Чем обусловлен выбор основного объекта исследования – кукурузы – для изучения действия стрессовых факторов на функционирование ферментов метаболизма 2ОГ? Связан ли этот выбор с С4 путем ассимиляции углерода в фотосинтезе и анатомо-физиологическими особенностями у растений *Zea mays* L.?
2. Одним из достоинств проведенного исследования является использование молекулярно-генетических и бионформатических подходов для изучения роли эпигенетического контроля активности ферментов. Хотелось бы уточнить у автора в каких условиях может изменяться статус метилирования CpG-островков ДНК у растений, какие молекулярные механизмы вовлечены в регуляцию этого процесса и какова скорость изменений метильного статуса при адаптации к абиотическим стрессорам?
3. Автором установлено отсутствие корреляции между метильным статусом промоторов и уровнем экспрессии *OGDH-1* и *OGDH-3* генов, кодирующих компоненты 2-оксоглутаратдегидрогеназного ферментного комплекса. Можно ли в данном случае констатировать «пассивную роль» эпигенетического механизма в регуляции функционирования 2ОГДК или следует сделать вывод об отсутствии эпигенетического контроля 2ОГДК через метилирование CpG-динуклеотидов? Почему изучена экспрессия и статус метилирования только двух из генов, кодирующих 2ОГДГ – *OGDH-1* и *OGDH-3*? Ген *OGDH-2* у кукурузы не идентифицирован?
4. Как по мнению диссертанта можно на основе полученных в исследовании данных и литературных источников оценить долю и роль трансляционной регуляции активности ферментов ЦТК среди других альтернативных способов регуляции их каталитической активности (например, субстратами/продуктами и эффекторами)?
5. Каким образом схематично можно было бы представить современное состояние вопроса об основных источниках 2ОГ в фотосинтезирующей и гетеротрофной растительной клетке на свету и в темноте?



6. В работе были получены и охарактеризованы по значениям константы Михаэлиса и оптимумов рН препараты ГДГ из листьев кукурузы и пшеницы. Сделано предположение о том, что разница в сродстве к 2ОГ может определяться разным соотношением субъединиц в составе полученных ферментных препаратов. Был ли проведен подсчёт такого соотношения или, может быть, он планируется в дальнейшей работе? Как определили наличие сопутствующих белков в очищенных препаратах ГДГ из листьев кукурузы (ГДГ-2 и ГДГ-3)? На дорожках электрофореграмм 2 и 3 в составе рисунка 12Б не просматривается дополнительных специфически окрашенных полос, свидетельствующих о гетерогенности белковой смеси.

7. На каких данных основаны предположения об изменении соотношения  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в составе изоформ ГДГ под действием солевого стресса в клетках листьев кукурузы? Не может ли появление более тяжелой изоформы ГДГ быть связано с посттрансляционной модификацией, например, фосфорилированием или ковалентным комплексообразованием?

Подчеркну, что вышеизложенные допущенные неточности несколько не умаляют ценность работы и заслуги её автора. Полученные результаты являются достоверными. Автор использовал адекватные поставленным задачам методы, грамотно осуществил проведение экспериментов и анализ полученных данных, выполнил эксперименты в достаточной для статистического анализа повторности.

**Заключение.** Диссертация Анохиной Галины Борисовны представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Многие факты получены впервые и при этом обладают высокой степенью научной новизны. Выводы, сделанные на основании проведенной работы, обоснованы и не вызывают сомнений. Все поставленные в работе задачи выполнены. Содержание автореферата отражает содержание диссертации. В итоге, можно заключить, что диссертационная работа Анохиной Галины Борисовны полностью соответствует требованиям "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а её автор - требованиям, предъявляемым к работам, представляемым к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по двум специальностям: 1.5.4 – «Биохимия растений» и 1.5.21 – «Физиология и биохимия растений».

19 сентября 2022 г.

Елена Владимировна Тютерева  
Кандидат биологических наук,  
Старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и экологической физиологии  
ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова  
Российской академии наук  
197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2  
(812) 372-54-00  
ETutereva@binran.ru

Подпись руки Тютерева Е.В.  
ЗАВЕРЯЮ и.о. н.д. с.к. [подпись]  
ОТДЕЛ КАДРОВ  
Ботанического института  
им. В.Л. Комарова  
Российской академии наук

Подпись заверен  
ВРИО директора  
Тютерева Е.В.  
19.09.22



[Handwritten signature]

/Е.В. Тютерева/