

«УТВЕРЖДАЮ»



Проректор ИИГУ по научной работе,

д.ф.-м.н.

М.В. Иванченко

« 19 » сентября 2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
на диссертацию Анохиной Галины Борисовны на тему:

«Анализ механизмов действия стрессовых факторов на функционирование ферментов метаболизма 2-оксоглутарата в листьях кукурузы», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.4 – биохимия и 1.5.21 – физиология и биохимия растений

Актуальность темы выполненной работы: Исследования, посвященные изучению механизмов адаптации растений к меняющимся условиям произрастания, не перестают быть актуальными. Ключевую роль при обеспечении устойчивости растительных организмов к среде обитания играют изменения в метаболизме клеток, проявляющиеся в изменении активности различных ферментных систем. 2-оксоглутаровая кислота является одним из важнейших интермедиатов как энергетического, так и пластического обменов. Изучение механизмов, регулирующих активность ферментов метаболизма 2-оксоглутарата, важно для понимания функционирования растительной клетки как в нормальных условиях, так и в условиях возникновения адаптивной реакции клеточного метаболизма к стрессовым факторам. Более того, исследование перестройки метаболических потоков раскрывает перспективы к созданию модифицированных сортов растений, устойчивых к экстремальным условиям произрастания.

Диссертационная работа Анохиной Г.Б. посвящена подробному и многостороннему изучению метаболизма 2-оксоглутаровой кислоты, обеспечивающего взаимодействие между катаболическими и анаболическими процессами в клетках растительных организмов. Целью работы является 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.

Значительное место в диссертационной работе занимают исследования молекулярных механизмов регуляции активности изучаемых ферментов и в особенности изоферментов 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, глутаматдегидрогеназы, дегидратазы дигидроксикислот. Процессы регуляции и перестройки метаболических потоков, между катаболизмом и анаболизмом, а также углеродным и азотным обменом в настоящее время изучены слабо, что позволяет считать тему исследований актуальной.

Научная новизна: Анохиной Г.Б. проведено комплексное исследование регуляции ферментов, принимающих участие в метаболизме 2-оксоглутарата, на биохимическом, генетическом и эпигенетическом уровнях. Получение высокоочищенных препаратов изоферментов ГДГ из листьев

кукурузы и пшеницы, дало возможность выявить отличия в их кинетических характеристиках. Впервые проведен анализ воздействия некоторых стрессовых факторов на ферментативную активность и накопление транскриптов генов этих энзимов. Впервые установлено, что функционирование 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса и глутаматдегидрогеназы в условиях засоления и гипоксического стресса регулируется на эпигенетическом уровне путем метилирования CpG-динуклеотидов промоторов их генов. Обнаружено участие фитохромной и криптохромной систем в трансдукции светового сигнала к генам исследуемых энзимов. Для генов семейства глутаматдегидрогеназ показана роль Ca^{2+} как мессенджера светового сигнала. Впервые исследовано влияние различных стрессовых факторов на активность оксидитратдегидратазы, которая способна метаболизировать оксидитрат до 2-оксоглутарата. Анализ уровня транскриптов генов этого фермента позволил выявить, что ген *DHAD1* кодирует полипептид, катализирующий окисление оксидитрата до 2-оксоглутарата, в то время как изофермент, кодируемый геном *DHAD2*, участвует в биосинтезе аминокислот с разветвленными боковыми цепями.

Теоретическая и практическая значимость: Результаты исследования имеют значение в области биохимии и физиологии растений, для понимания механизмов регуляции ферментов метаболизма 2-оксоглутарата, реализуемых в растениях в различных условиях произрастания. Выявленные закономерности регуляции работы ферментов могут быть использованы при создании генно-модифицированных линий растений, обладающих повышенной продуктивностью, урожайностью, и устойчивых к действию различных стрессоров. Разработанные праймеры для метил-специфичной полимеразной цепной реакции и бисульфитного секвенирования будут полезны для проведения анализа эпигенетического контроля ферментных систем обмена 2-оксоглутарата. Данные, представленные в диссертационной работе, могут быть использованы в образовательном процессе при чтении курсов лекций по биохимии, энзимологии, физиологии растений и других спецкурсов.

Оценка содержания диссертации. Диссертационная работа изложена на 201 страницах, включая список литературы и приложение. Иллюстрационный материал включает 54 рисунка и 5 таблиц. Приложение содержит 20 рисунков и 10 таблиц. Структура работы традиционна и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы (203 источника).

Раздел «Введение» представляет собой обзорное введение в проблему, в которой автор обозначает актуальность темы исследований и формулирует цель и задачи. Автором подчеркнута важная роль 2-оксоглутаровой кислоты в пластическом и энергетическом обменах, и достаточно подробно изложен исследуемый участок клеточного метаболизма 2-оксоглутарата, с указанием ферментных систем, принимающих в нем участие. Раздел написан хорошим научным языком и отражает современные научные представления по теме диссертационной работы.

Первая глава – «Обзор литературы» представляет собой подробный анализ имеющихся научных данных по теме исследований и разделен на несколько подразделов. В первой части обзора литературы автор рассматривает биохимические, регуляторные и молекулярно-генетические характеристики ферментных систем, принимающих участие в метаболизме 2-оксоглутаровой кислоты: 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (с указанием компонентов, формирующих данный метаболит); глутаматдегидрогеназы, дегидратазы дигидроксикислот (оксидитратдегидратаза декарбоксилирующая), компонентов шунта γ -аминомасляной кислоты. Вторая часть раздела включает критический обзор научных данных, посвященных исследованиям роли 2-оксоглутарата в клеточном метаболизме, а также, основные аспекты адаптивной реакции растительных клеток к действию различных стрессовых факторов (высокие концентрации солей, изменение светового режима, гипоксия).

Обзор литературы производит хорошее впечатление, демонстрирует знание автором материала исследований, может быть использован для написания методических и учебных пособий.

В начале второй главы «экспериментальная часть» автор дублирует формулировку цели и задач исследования.

Раздел «объекты и методы исследования» начинается с описания растительных объектов, использованных в работе: проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская-76. В некоторых экспериментах дополнительно применялись проростки сахарной свёклы *Beta vulgaris* L. сорта MC17017, проростки пшеницы *Triticum aestivum* L., сорта Московская-40, проростки *Arabidopsis thaliana* L. четырех линий: дикого типа (Col-0) и нокаутных по генам фоторецепторов: фитохрома А (*phyA-201*), фитохрома В (*phyB-1*), криптохрома (*cry-4*).

В последующем автор приводит описание проведенных экспериментов, а также методы, использованные в работе. В рамках проведенного исследования диссертантом были применены различные методы биохимии и молекулярной биологии. Завершается раздел подробным описанием статистической обработки полученных данных. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0. Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента. Для множественных сравнений критерий Стьюдента использовался с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA.

Раздел «Результаты и обсуждение» диссертационной работы включает три крупных подраздела, посвященных влиянию различных факторов (солевой стресс, свет различного спектрального состава, гипоксия) на функционирование ферментов, принимающих участие в метаболизме 2-оксоглутаровой кислоты, которые разбиты на параграфы, соответствующие каждому из рассматриваемых ферментных систем (2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс, глутаматдегидрогеназа, дегидратаза дигидроксикилот, сукцинат семиальдегиддегидрогеназа) с указанием конкретного этапа работы. Данный раздел диссертации достаточно четко структурирован. Описание полученных результатов подробно и позволяет в полной мере оценить полученные результаты и сформировать выводы. Каждый подраздел завершается небольшим заключением, которое позволяет систематизировать и обобщить полученные результаты.

Подраздел «Влияние солевого стресса на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ» включает подробное описание результатов определения субклеточной локализации 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, глутаматдегидрогеназы и дегидратазы дигидроксикилот, измерения динамики их активности в условиях инкубации проростков растений в 150 мМ растворе хлорида натрия. Кроме того, проведен сравнительный анализ уровня транскриптов генов исследуемых ферментных систем от степени метилирования CpG-динуклеотидов их промоторов в условиях засоления. Раздел включает результаты определения уровня пролина в листьях кукурузы в условиях инкубации проростков в солевом растворе, которые позволяют оценить динамику возникновения стрессового ответа и демонстрирует наличие солевого стресса в экспериментальных условиях.

Диссертантом выявлен активирующий эффект солевого стресса, вызванного 150 мМ раствором NaCl на ферментативную активность 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, глутаматдегидрогеназы и дегидратазы дигидроксикилот. Увеличение активности этих ферментов обусловлено увеличением транскрипционной активности их генов и регулируется за счет изменения степени метилирования их промоторов.

Кроме того, проведена оценка уровня транскриптов генов сукцинатсемиальдегиддегидрогеназы, конечного фермента ГАМК-пути, показана активация гена *SSADH1* при засолении.

Также подраздел содержит результаты многостадийной очистки глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы (три изоформы) и проростков пшеницы (одна изоформа) и определения чистоты полученных препаратов. Диссертантом определен pH-оптимум работы изоформ глутаматдегидрогеназы и установлены значения констант Михаэлиса по 2-оксоглутарату и глутамату.

Подраздел завершается обобщающей частью, содержащей краткое резюме полученных результатов и выводы по данной части диссертационной работы.

В подразделе «Влияние света различного спектрального состава на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ» автор описывает результаты исследования общей ферментативной активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, глутаматдегидрогеназы и дегидратазы дигидрохлоридов, анализ уровня транскриптов их генов и метильного статуса их промоторов в растениях, подверженных облучению светом различного спектрального состава. Структура данного раздела аналогична предыдущему. Примечательно, что исследования влияния светового режима на функционирование 2-оксоглутаратдегидрогеназы проводились и на проростках кукурузы и на проростках *Arabidopsis thaliana* четырех линий, три из которых были нокаут-мутантами по генам фоторецепторов. Кроме того, эксперименты с использованием рутения красного и ЭГТА выявили участие ионов кальция в передаче светового сигнала к генам семейства глутаматдегидрогеназ. Полученные результаты продемонстрировали ключевую роль фитохромной системы в процессе передачи сигнала к генам 2-оксоглутаратдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы и дегидратазы дигидрохлоридов. Данный подраздел также завершается небольшим заключением по данной части исследования, которое иллюстрирует гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы при смене светового режима, представленная в приложении.

В третьем подразделе «Влияние гипоксии на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ» автор дает описание результатов влияния гипоксии на динамику активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы и дегидратазы дигидрохлоридов в листьях кукурузы, уровень транскриптов генов этих ферментов и степень метилирования их промоторов. Кроме того, исследована динамика изменения относительного уровня транскриптов генов сукцинатсемиаальдегиддегидрогеназы в листьях кукурузы при гипоксии, что позволило диссертанту сделать предположение об активации ГАМК-шунта в условиях гипоксического стресса. Заключение данного подраздела также систематизирует и обобщает полученные результаты. Гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы в гипоксических условиях, иллюстрирующая эту часть, представлена в приложении.

В заключении диссертационной работы приведены итоги комплексного и содержательного исследования. Обобщены полученные данные о влиянии стрессовых факторов на метаболизм 2-оксоглутаровой кислоты в растительных клетках. Диссертантом представлена логичная и достоверная гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов, принимающих участие в метаболизме 2-оксоглутарата в растениях в условиях солевого стресса.

Выводы, сформулированные автором, соответствуют поставленным задачам, достоверны и обоснованы.

Вместе с тем анализ работы позволяет сделать некоторые замечания и задать вопросы:

1. При описании объектов исследования не указан возраст растений кукурузы и пшеницы. Лишь в пункте 1.3.2 главы II указано, что эксперимент был проведен на 10-дневных проростках кукурузы. Остальные эксперименты были выполнены также на проростках кукурузы этого возраста? Также не приведено обоснование выбора видов растений, используемых в работе.
2. Какие условия, с которыми встречаются растения в природе, моделируются помещением побеговой части растений в солевой раствор или безкислородную среду?
3. Поясните, пожалуйста, как проводились эксперименты по освещению растений светом с разными спектральными характеристиками. В описании экспериментов указано, что

растения выдерживались в темноте, затем в течение 15 минут освещались различным светом и материал для анализа забирался через 3 часа. В каких световых условиях растения находились в это время?

4. К сожалению, в методической части отсутствует объяснение того как распределяются клеточные фракции/органеллы в градиенте плотности сахарозы при изоплотностном центрифугировании. Это пояснение могло бы упростить восприятие полученных результатов.
5. При исследовании глутаматдегидрогеназы листьев кукурузы отмечается, что полученный ферментный препарат содержит доминирующее количество β -субъединиц. На чем основано это утверждение?
6. В работе упоминаются аминокислоты с разветвленными боковыми цепями. Поясните, пожалуйста, какие аминокислоты относятся к этой группе, какова их роль в растительной клетке?
7. Поясните, пожалуйста, что подразумевается под термином «стрессовый ответ», который вызывается у растений солевым воздействием и гипоксией?
8. На наш взгляд в работе, а именно в обзоре литературы и обсуждении результатов, недостаточно четко описаны предполагаемые механизмы и пути регуляции активности изучаемых ферментов на биохимическом, генетическом и эпигенетическом уровне. Каким образом клетка воспринимает сигналы от анализируемых в работе абиотических факторов и регулирует степень метилирования промоторов, и работу ферментативных белков?

Замечания:

1. На приведенных в диссертационной работе графиках не отмечены экспериментальные точки, где имеются статистические различия. Всегда ли показатели опытных групп отличались от контрольных?
2. В работе используются как минимум три варианта названия соли: NaCl, хлорид натрия и натриевая соль соляной кислоты. На наш взгляд для удобства восприятия и сокращения текста следует использовать только химические символы NaCl во всем тексте диссертации.
3. Является ли ГАМК для растений нейромедиатором? (стр. 98).

Указанные выше замечания, тем не менее, не умаляют достоинств рецензируемой работы. Результаты исследований прошли апробацию на международных и Российских конференциях.

Анохина Г.Б. имеет достаточное количество публикаций в журналах из списка ВАК, которые содержат основные результаты представляемой диссертационной работы. По материалам диссертации автором опубликованы 18 работ, из них 8 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 6 из них индексируются в Web of Science и Scopus

Анализ представленного диссертантом материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов. Выводы аргументированы и в целом объективно отражают полученные экспериментальные данные. Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы.

Заключение

На основании всего вышеизложенного можно сделать заключение, что диссертационная работа Анохиной Галины Борисовны на тему: «Анализ механизмов действия стрессовых факторов на функционирование ферментов метаболизма 2-оксоглутарата в листьях кукурузы», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.4 – биохимия

и 1.5.21 – физиология и биохимия растений, является законченным научно-исследовательским трудом, который был выполнен автором самостоятельно. Работа выполнена на стыке двух специальностей и содержит новые сведения о регуляции активности ферментативных систем углеводного и азотного обмена, ключевого звена физиологии и биохимии растений. Данные, полученные с помощью адекватных методов, достоверны и репрезентативны. Выводы о физиологической роли ферментов, метаболизирующих 2-оксоглутаровую кислоту при адаптации растительных организмов к действию некоторых абиотических стрессовых факторов обоснованы. Диссертационная работа Анохиной Г.Б. соответствует требованиям пунктов 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» № 842, утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года (с изменениями от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Анохина Галина Борисовна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.4 – биохимия и 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании кафедры биохимии и биотехнологии Института биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (ННГУ), протокол № 3 от «16» сентября 2022г.

Отзыв составлен заведующей кафедрой биохимии и биотехнологии, кандидатом биологических наук (03.01.05 – физиология и биохимия растений), доцентом (03.01.04 Биохимия)

Брилкина Анна Александровна

Полное наименование: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Сокращенное наименование Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (ННГУ)

Почтовый адрес: 603022, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

Официальный сайт организации: <http://www.ibbm.unn.ru/>

Адрес электронной почты: ibbm@unn.ru

Телефон: 8(831) 462-32-02; факс (831) 462-32-02

