

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Никитиной Марины Викторовны

на тему: «Метаболитная и экспрессионная регуляция аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активности в растениях с разным типом метаболизма»  
по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Актуальность темы.** Исследование ферментативных механизмов регуляции метаболических процессов, которые обеспечивают жизнедеятельность растительного организма, является одним из приоритетных направлений современной физиологии и биохимии растений. Сегодня многие вопросы, связанные с ролью ключевых ферментов крупных энергетических путей в растениях, остаются невыясненными, а именно: влияние аконитатгидратазы (АГ), изоцитратлиазы (ИЦЛ) на метаболизм органических кислот, превращение двухуглеродных соединений в фотодыхании. Не изучены вопросы субклеточной локализации указанных ферментов, их метаболитной регуляции в растениях с разным типом метаболизма, изоферментный состав. В связи с этим проведение исследований, связанных с разработкой препаративных способов получения ферментов в электрофоретически гомогенном состоянии, выяснение их генетической детерминированности, сравнительный анализ функционирования ферментов в  $C_3$ - и  $C_4$ -растениях является актуальной задачей, позволяющей уточнить функциональную значимость АГ и ИЦЛ, в частности.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.** Структура и логика изложения соответствуют поставленным в диссертации задачам исследования. Для решения поставленных задач автором на достаточно высоком научном уровне изучаются и критически анализируются известные достижения других авторов по вопросам

понимания роли исследуемых ферментов в осуществлении механизмов регуляции метаболических процессов растительного организма. Список литературы насчитывает 208 наименований, в том числе 168 на иностранных языках. Выводы и результаты, полученные диссертантом, обоснованы и достоверны, так как опираются на результаты анализа обширного теоретического и экспериментального материала.

**Научная новизна** диссертационного исследования состоит в том, что автором впервые получены данные, которые свидетельствуют о важной роли изоферментов АГ и ИЦЛ в механизмах трансформации метаболических потоков в клетке растений. Установлено, что субклеточное распределение исследуемых ферментов связано с их физиологической ролью обеспечения функционирования цикла трикарбоновых кислот, глиоксилатного цикла, а также метаболизма органических кислот, двухуглеродных соединений фотодыхания. Автором установлена роль транс-аконитата и конечных продуктов глюконеогенеза в регуляции функционирования митохондриальных и цитоплазматических изоформ АГ и ИЦЛ в растениях с различным типом основного метаболизма. Идентификация генов исследуемых ферментных систем показала, что множественные молекулярные формы АГ и ИЦЛ являются изоферментами, то есть генетически детерминированными формами. Впервые выявлено, что функционирование аконитазной и изоцитратлиазной активности регулируется экспрессией соответствующих генов, кодирующих эти ферменты.

**Значимость для науки и практики** выполненной работы связана, в первую очередь, с перспективами дальнейшего использования электрофоретически гомогенных препаратов изоферментов АГ, ИЦЛ из кукурузы, амаранта, сои, а именно:

- в научно-исследовательских целях для изучения регуляторных особенностей ферментативных реакций, физико-химических характеристик ферментов;

- при проведении иммуноферментного анализа тканей организмов, находящихся в экстремальных условиях.

Кроме того, материалы диссертационной работы будут активно использоваться в ходе проведения учебного процесса на биолого-почвенном факультете ВГУ при чтении лекций по дисциплинам «Физиология растений», «Биохимия», «Молекулярная биология», при проведении практикумов, выполнении курсовых, бакалаврских и магистерских работ, а также при подготовке рукописей монографий, учебных пособий и учебников.

**Структура работы.** Диссертация Никитиной М.В. включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть и обсуждение результатов, заключение, выводы и список использованных источников. Объем работы составляет 144 страницы машинописного текста, включает 43 рисунка и 13 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, кратко охарактеризована степень научной разработанности проблемы, четко сформулированы цель и задачи исследования, новизна и значимость полученных результатов, а также положения, выносимые на защиту.

Целью диссертационной работы являлось исследование метаболической и экспрессионной регуляции изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы, выделенных и очищенных до электрофоретически гомогенного состояния из кукурузы, сои и амаранта.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать органную специфичность изоферментного состава аконитазы и изоцитратлиазы при прорастании растений.

2. Изучить субклеточную локализацию изоферментов АГ и ИЦЛ в кукурузе, сое и амаранте.

3. Получить в электрофоретически гомогенном состоянии изоферменты аконитатгидратазы и изоцитратлиазы из растений с помощью многостадийной схемы очистки.

4. Провести изучение типа и механизма ингибирования аконитатгидратазы из растений с помощью транс-аконитовой кислоты и других органических кислот.

5. Выяснить степень ингибирования изоцитратлиазной активности в кукурузе, сое и амаранте конечными продуктами глюконеогенеза.

6. Исследовать влияние активных форм кислорода (перекиси водорода) на функционирование изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы, выделенных из растений.

7. Подобрать специфические праймеры для идентификации генов аконитатгидратазы. Исследовать экспрессионную регуляцию генов аконитатгидратазы в проростках кукурузы и амаранта.

8. С помощью специфических праймеров для генов *icl1* и *icl2* и ПЦР-РВ исследовать зависимость уровня экспрессии генов на стадии прорастания.

9. Разработать гипотетическую схему регуляции функционирования изоферментов АГ и ИЦЛ на экспрессионном и метаболитном уровне.

В первой главе «Обзор литературы» автор освещает уровень современных исследований по теме диссертационной работы. Никитиной М.В. подробно представлены следующие сведения о таких ферментах как АГ и ИЦЛ:

- физиологическая роль ферментов в основных путях энергетического метаболизма у организмов различных систематических групп;

- физико-химические и регуляторные особенности ферментов, включающие вопросы процедуры очистки АГ и ИЦЛ, данные о молекулярной массе ферментов, их каталитических свойствах, об известных активаторах и ингибиторах, а также о механизме действия;

- молекулярные аспекты функционирования ферментов, отражающие вопросы идентификации и регулирования генов АГ и ИЦЛ из клеток растений, дрожжей.

Во второй главе «Экспериментальная часть» представлена информация об основных объектах исследования, а также изложены методы, используемые автором для проведения научных исследований. Результаты собственных исследований и их обсуждение автор излагает в 18 разделах, имеющих ряд подразделов.

В диссертационной работе результаты проведенных экспериментов автор излагает параллельно для исследуемых ферментов. Первоначальной задачей явилось изучение изоферментного состава АГ и ИЦЛ из растений с различным типом метаболизма, а также внутриклеточного распределения этих ферментов (разделы 2.2.1 - 2.2.5). Соискателем установлено, что ферменты проростков кукурузы, сои и амаранта характеризуются наличием изоферментного состава, представленного одной или двумя множественными молекулярными формами с различной относительной электрофоретической подвижностью и спецификой внутриклеточного распределения.

Следующие разделы посвящены разработке схемы очистки ферментов из растительных источников (разделы 2.2.6 - 2.2.14). С помощью пятистадийной схемы очистки автором получены электрофоретически гомогенные препараты АГ и ИЦЛ из исследованных растений. Важно отметить, что характеристики очищенных ферментов имеют значения, аналогичные таковым, полученным из других источников. Из всех изучаемых растений получено две формы АГ, причем эффективное разделение изоферментов было обеспечено применением ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Степень очистки АГ из разных растений варьировала в от 79 до 133 раз в зависимости от объекта выделения. Автор отмечает, что самым консервативным показателем был выход активности ферментов (3-4 %). Степень очистки гомогенных препаратов изоформ ИЦЛ колебалась в пределах от 57 до 87 раз, что было обусловлено

разным значением величины удельной активности в гомогенате исследуемых растений. Отмечается, что для очистки ИЦЛ из растительных объектов характерен значительно более высокий уровень выхода ферментативной активности, который колебался от 6,5 % у сои до 9 % у амаранта.

Результаты исследований по метаболитной регуляции активности ферментов в растениях представлены в разделе 2.2.15. Никитиной М.В. выявлен конкурентный механизм ингибирования АГ с помощью транс-аконитовой кислоты. Показано, что наибольшая устойчивость к этому интермедиату характерна для АГ из кукурузы, способной в процессе жизнедеятельности накапливать значительные количества этого интермедиата. Соискателем установлено, что митохондриальный изофермент АГ более чувствителен к транс-аконитату по сравнению с цитоплазматической формой фермента. Исоцитратлиазная активность сильно ингибируется конечными продуктами глюконеогенеза (глюкозо-1-фосфатом и глюкозо-6-фосфатом). Определенные автором константы и тип ингибирования показали, что глиоксисомальная изоформа ИЦЛ оказалась более устойчива по сравнению с цитоплазматическим изоферментом.

Материалы исследования влияния перекиси водорода на активность ферментов АГ и ИЦЛ представлены в разделах 2.2.16 - 2.2.17. Автором учитывались факторы, обеспечивающие взаимодействие перекиси водорода с железо-серным кластером, входящим в состав АГ. В ходе исследований установлено ингибирующее действие различных концентраций перекиси водорода на изоферменты АГ, имеющие различную субклеточную локализацию. Доказано, что митохондриальный изофермент АГ более чувствителен к перекиси водорода по сравнению с цитоплазматической изоформой АГ. В то время как инкубация изоферментов ИЦЛ (глиоксисомального и цитоплазматического) с перекисью водорода в обозначенных концентрациях не приводила к изменению функционирования фермента. Сравнение действия этого вещества на глиоксисомальную и

цитоплазматическую формы фермента также показало практически полную устойчивость ИЦЛ.

Важной частью исследования, несомненно, являлось выяснение экспрессионной активности генов, кодирующих изучаемые ферменты (раздел 2.2.18). Автором установлено, что уровень экспрессии генов *aco1* и *aco2* максимален в первые дни прорастания семян, причём для гена *aco1* наблюдалась экспрессия на протяжении всего периода прорастания семян кукурузы и амаранта. Полученные результаты, свидетельствующие о дифференциальной экспрессии генов АГ при развитии растения, соотносит с разной функциональной ролью изоферментов АГ. Анализ экспрессии генов, кодирующих ИЛ, показал, что гены *icl1* и *icl2* транскрибируются на протяжении всего периода прорастания семян, и принимают участие в формировании разных функциональных форм ИЦЛ. Никитина М.В. указывает, что транскрипция гена *icl1* четко совпадает с активацией процессов метаболизации запасных жиров и предполагает, что данный ген кодирует соответствующий изофермент. Экспрессия гена *icl2* обуславливает синтез дополнительной формы ИЦЛ для осуществления анаэробных реакций.

В заключении сформулированы основные результаты диссертационного исследования, представлена гипотетическая схема регуляции функционирования исследуемых ферментных систем в растительной клетке. Представленные Никитиной М.В. выводы отражают основное содержание ее диссертационной работы.

В целом диссертационная работа обладает четкой структурой, материал подается автором в логической последовательности, продиктованной поставленной целью и раскрывающими ее задачами. Диссертация написана грамотным научным языком, содержит необходимое количество иллюстративного материала.

**Достоверность результатов исследований** не вызывает сомнений: все эксперименты проведены обстоятельно, со статистическим анализом с использованием современных методов молекулярной биологии и биохимии. Основные результаты диссертации опубликованы в 14 печатных работах, в том числе в 3-х статьях, рекомендованных ВАК РФ к защите докторских и кандидатских диссертаций. Работа Никитиной М.В. прошла широкую апробацию на конференциях различного уровня.

Однако, несмотря на имеющиеся многочисленные достоинства работы, в ней обнаруживаются и некоторые **недостатки**:

1. При описании методики проведения электрофоретических исследований полученных препаратов АГ и ИЦЛ, к сожалению, не сообщается о количестве белка, содержащегося в пробах, разделяемых в полиакриламидном геле.

2. Автор проделал большую работу по очистке исследуемых ферментов из разных растений до электрофоретически гомогенного состояния. Однако в диссертации нет информации о хранении электрофоретически гомогенных препаратов. Как долго сохранялась активность ферментов после многостадийной очистки?

3. В исследованиях по субклеточной локализации АГ и ИЦЛ автор использовала маркерные ферменты для определения степени перекрестного загрязнения выделяемых органоидов. На мой взгляд, использование лактатдегидрогеназной активности для идентификации цитоплазматической фракции могло сыграть определенную положительную роль.

4. Интересные исследования по экспрессии генов изоферментов АГ и ИЦЛ, на мой взгляд, в будущем должны дополняться изучением роли транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генома.

Отмеченные недостатки не снижают высокого качества исследования, не влияют на главные теоретические и практические результаты диссертации, описанные выше. Результаты обладают научной новизной и



практически значимы, демонстрируют вклад автора в области физиологии и биохимии растений, подтверждают его понимание практической целесообразности полученных результатов.

**Заключение о соответствии диссертации установленным требованиям.** Таким образом, диссертация Никитиной М.В. является научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение вопросов метаболитной и экспрессионной регуляции изоферментов АГ и ИЦЛ в растительном организме, имеющих значение для развития исследований в области физиологии и биохимии растений. Считаю, что диссертационная работа полностью соответствует требованиям Положения о порядке присуждении ученых степеней, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Никитина Марина Викторовна достойна присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент,

кандидат биологических наук,

доцент кафедры биохимии и биотехнологии

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный

университет инженерных технологий»

394036, Россия, г. Воронеж,

проспект Революции, д. 19

тел. +7(473)255-55-57

e-mail: olga\_bojko2005@mail.ru

/ О.Ю. Гойкалова/

28.11.2014 г.

