

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора,
зав. кафедрой биологии растений и животных Воронежского
государственного педагогического университета Ершовой А.Н.
на диссертацию Никитиной Марины Викторовны
«Метаболитная и экспрессионная регуляция аконитатгидратазной и
изоцитратлиазной активности в растениях с разным типом метаболизма»,
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности: 03.01.05 – физиология и биохимия растений

В кандидатской диссертации Никитиной Марины Викторовны рассматривается актуальная проблема, связанная с изучением особенностей регуляции функционирования аконитатгидратазной и изоцитратлиазной ферментных систем в растениях с разным типом основного метаболизма.

Аконитатгидратаза (КФ 4.1.2.3.) и изоцитратлиаза (КФ 4.1.3.1.) являются важными ферментами, которые обеспечивают функционирование цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного пути при прорастании семян растительных организмов. Координация работы этих важнейших метаболических потоков осуществляется на разных уровнях организации ферментных систем и дифференциальной экспрессии их генов. Субклеточная локализация, изоферментный состав, метаболитная регуляция аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растениях с разным типом основного метаболизма практически не изучены. Для решения этих проблем необходимо проведение исследований, связанных с разработкой препаративных способов получения энзимов в электрофоретически гомогенном состоянии и выяснением их генетической детерминированности.

В своих исследованиях автор использовал растения кукурузы, амаранта, относящиеся к так называемому C₄-типу фотосинтеза, и сою, являющуюся C₃-растением, что позволяет уточнить функциональную значимость этих энзимов для разных групп растений.

В связи с этим была поставлена цель - исследовать метаболитную и экспрессионную регуляцию изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы, выделенных и очищенных до электрофоретически гомогенного состояния из кукурузы, сои и амаранта.

Выполняя исследование по теме диссертационной работы, Никитина Марина Викторовна получила интересные результаты.

Результаты, представленные автором, имеют важное значение для понимания роли изоферментов АГ и ИЦЛ в механизмах трансформации метаболических потоков в растительной клетке. Внутриклеточное распределение изоферментов АГ и ИЦЛ свидетельствует об их участии в таких важнейших процессах, как ЦТК, глиоксилатный цикл, метаболизм органических кислот и обмен двууглеродных соединений при фотодыхании. Получены данные, показывающие важное значение транс-аконитата и конечных продуктов глюконеогенеза в регуляции функционирования митохондриальных и цитоплазматических изоформ аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растениях с различным типом основного метаболизма. Молекулярно-биологические аспекты исследований позволили разработать специфические праймеры для идентификации генов исследуемых энзимных систем и показать, что множественные молекулярные формы АГ и ИЦЛ являются изоферментами, то есть генетически детерминированными формами. Выявлено, что функционирование аконитазной и изоцитратлиазной активности регулируется экспрессией соответствующих генов, кодирующих эти ферменты.

Для решения поставленных задач автор использовал самые современные методы биохимии и молекулярной биологии. Автор применял электрофоретические методы исследования для определения изоферментного состава аконитатгидратазы и изоцитратлиазы, эффективную методику выделения препаратов изоферментов и очистки их с помощью многостадийной схемы, включающей высаливание сульфатом аммония, гель-фильтрацию, гель-хроматографию на сефадексах и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе.

Значительное место в диссертационной работе занимают методы молекулярной биологии. Так, автор использовал различные виды полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР, ПЦР в реальном времени), а также секвенирование ампликонов геномной ДНК растений и разработал специфические праймеры для идентификации соответствующих генов, кодирующих изоферменты АГ и ИЦЛ.

Диссертационная работа Никитиной Марины Викторовны «Метаболическая и экспрессионная регуляция аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активности в растениях с разным типом метаболизма» изложена на 147 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (208 источников). Иллюстрационный материал включает 43 рисунка, 13 таблиц.

В диссертационной работе содержится достаточно хороший литературный обзор, освещающий основные проблемные вопросы, связанные с исследованием регуляторных аспектов функционирования аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растительных, животных и микроорганизмах. Автор делает анализ физиологической роли изоферментных комплексов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растениях. Подробно рассматриваются вопросы распространения и функционирования ЦТК и глиоксилатного цикла в разных живых организмах и их физиологическое значение. Анализируются литературные источники, посвященные физико-химическим, кинетическим, каталитическим и регуляторным характеристикам изучаемых ферментных систем.

Значительное место в литературном обзоре посвящено генетической детерминации изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы и характеристике эволюционных механизмов генезиса данных ферментных систем в организмах растительного и животного происхождения.

Анализ литературных публикаций по теме диссертации позволил сделать автору заключение о полифункциональной роли, выполняемой

аконитатгидратазой и изоцитратлиазой в растениях разного возраста и характеризующихся различным типом основного обмена.

В работе подробно описаны объекты и методы исследования, что позволяет легко воспроизвести проводимые автором эксперименты.

Результаты исследования, приведенные в первых двух разделах диссертационной работы, посвящены исследованию изоферментного состава и внутриклеточного распределения активности АГ и ИЦЛ в растениях с разным типом основного метаболизма. Электрофоретические исследования позволили установить наличие двух изоформ АГ и ИЦЛ, отличающихся по электрофоретической подвижности, что позволило предположить их участие в разных метаболических процессах. Так, в глиоксилатном цикле функционирует быстродвижущаяся форма ИЦЛ, а в метаболизме двууглеродных кислот – медленнодвижущаяся. При этом автор продемонстрировал их различную субклеточную локализацию методом дифференциального и изоплотностного центрифугирования.

Внутриклеточное распределение аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активности имеет специфические особенности. Аконитатгидратаза локализована в цитоплазматической и митохондриальной фракциях. Изоцитратлиазная активность обнаружена в глиоксисомальной и цитозольной фракциях. Такое субклеточное распределение активности исследуемых ферментов, по мнению диссертанта, связано с их физиологической ролью обеспечения функционирования ЦТК (АГ), глиоксилатного цикла (ИЦЛ), метаболизма органических кислот и метаболизма двухуглеродных соединений фотодыхания. Однако автором не учитывается и достаточно высокая активность АГ в глиоксисомах кукурузы- 26,8 %, амаранта-27,4 % и сои-54,8% от общей активности, если пересчитать данные, представленные в таблицах № 3,4,5. При этом изменяются и результаты распределения активности маркерного фермента СДГ по клеточным компартментам в данных таблицах.

Несомненным успехом автора следует считать получение в электрофоретически гомогенном состоянии препаратов изоферментов

аконитатгидратазы и изоцитратлиазы. Для этого была использована многостадийная схема очистки, в которой ключевую роль в разделении изоферментов играла ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе.

Получение в гомогенном состоянии изоферментов АГ и ИЦЛ позволило автору исследовать их регуляторные характеристики.

Выявлен конкурентный механизм ингибирования аконитатгидратазы растений с помощью транс-аконитовой кислоты. Показано, что наибольшая устойчивость к этому интермедиату характерна для АГ из кукурузы, которая способна в процессе жизнедеятельности накапливать значительные количества этого интермедиата в своих клетках. Кроме того, установлено, что митохондриальный изофермент аконитазы более чувствителен к транс-аконитату ($K_i = 2,6$ мМ) по сравнению с цитоплазматической формой фермента ($K_i = 3,5$ мМ).

Установлено, что изоцитратлиазная активность сильно ингибируется конечными продуктами глюконеогенеза (глюкозо-1-фосфатом и глюкозо-6-фосфатом). Определенные константы и тип ингибирования показывают, что глиоксисомальная изоформа ИЦЛ более устойчива ($K_i = 0,745$ мМ) по сравнению с цитоплазматическим изоферментом ($K_i = 0,973$ мМ).

В следующей части диссертации рассматриваются молекулярно-биологические аспекты функционирования генов изоферментов АГ и ИЦЛ.

Использование специфических праймеров для митохондриальной и цитоплазматической форм аконитатгидратазы позволило идентифицировать их транскрипты в суммарной вытяжке РНК. Активная экспрессия генов обеих форм аконитазы в щитках кукурузы и семенах амаранта обусловлена необходимостью синтеза пептидов для протекания энергетических и биосинтетических процессов в клетках растущего растительного организма.

Установлено, что уровень экспрессии генов *aco1* и *aco2* максимален в первые дни прорастания семян, причём ген *aco1* сохранял высокую активность на протяжении всего периода прорастания семян кукурузы и амаранта. Полученные результаты свидетельствуют о дифференциальной

экспрессии генов аконитатгидратазы при развитии растения, что обусловлено разной функциональной ролью ее изоферментов.

Анализ экспрессии генов, кодирующих изоцитратлиазу, показал, что гены *icl1* и *icl2* транскрибируются во все периоды прорастания семян, и, вероятно, принимают участие в формировании разных функциональных форм ИЦЛ. Транскрипция гена *icl1* четко совпадает с активацией процессов метаболизации запасных жиров и данный ген, предположительно, кодирует соответствующий изофермент. Экспрессия гена *icl2*, вероятно, обуславливает синтез дополнительной формы для осуществления анаэробических реакций.

Представленные Никитиной Мариной Викторовной выводы отражают основное содержание ее диссертационной работы.

К сожалению, работа не лишена и некоторых недостатков. Наиболее существенными из них являются следующие:

1. Трудно согласиться с утверждением автора, что в исследуемых растениях АГ локализована в основном в цитоплазме и митохондриях. Данные таблиц № 3,4,5 на это однозначно не указывают, особенно если учесть и распределение маркерного фермента СДГ.
2. В работе были получены электрофоретически гомогенные препараты изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы из разных растений. Однако автор не обсуждает вопросы, связанные с хранением этих препаратов, что может иметь важное значение для их практического применения.
3. Для доказательства того, что обнаруженные множественные молекулярные формы изучаемых ферментов являются изоферментами, автор использовал современный метод ПЦР-анализа с помощью системы специфических праймеров. Можно рекомендовать в перспективе использовать и сиквенс изоферментов, что позволит получить дополнительные аргументы в пользу генетической детерминации множественных молекулярных форм энзимов.

4. Автор в своем исследовании много внимания уделяет экспрессии генов аконитазы и изоцитратлиазы при прорастании семян кукурузы и амаранта. Однако мало уделено внимания выяснению механизмов регуляции уровня транскрипции генов этих ферментов и выяснению механизмов регуляции уровня транскрипции генов этих ферментов и выяснению роли эпигенетических механизмов, обеспечивающих дифференциальную экспрессию генов *icl1* и *icl2*, *aco1* и *aco2* при прорастании семян.
5. Жаль, что в хорошей серьезной работе присутствует определенная небрежность в оформлении списка литературы, в котором часть ссылок (39,40,46,47,52,55 и т.д.) приведена не в соответствии со стандартом.

Диссертационная работа Никитиной Марины Викторовны «Метаболическая и экспрессионная регуляция аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активности в растениях с разным типом метаболизма» представляет собой законченный научный труд. Выводы диссертационной работы теоретически обоснованы. Диссертация хорошо оформлена. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертационной работы.

Считаю, что кандидатская диссертация полностью соответствует требованиям п.8 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК России, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Никитина Марина Викторовна достойна присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Заведующая кафедрой биологии растений
и животных Воронежского государственного
педагогического университета, профессор,
доктор биологических наук

01.12.2014г.
Ершова Антонина Николаевна
ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный
педагогический университет»
394043 РФ, г. Воронеж, ул. Ленина, 86
e-mail: aershova@vspu.ac.ru
Тел. 8(473) 253-29-86



Ершова А.Н.

Подпись Ершова А.Н. Заверяю
Начальник упр. я КД, упр. ВТМ

01.12.2014