

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института физиологии  
растений им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук  
чл.-корр. РАН  
**Вл.В. Кузнецов**



24 ноября 2014 г.

### **Отзыв ведущей организации**

о диссертационной работе НИКИТИНОЙ МАРИНЫ ВИКТОРОВНЫ  
«Метаболитная и экспрессионная регуляция аконитатгидратазной и  
изоцитратлиазной активности в растениях с разным типом метаболизма»,  
представленной на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.01.05 – физиология и биохимия растений

Детальное исследование ферментативных механизмов регуляции метаболических процессов до сих пор является одним из важных аспектов изучения жизнедеятельности растительного организма. Несмотря на многолетние исследования свойств отдельных ферментов и их взаимодействий, многие вопросы, связанные с регуляцией функционирования цикла трикарбоновых кислот, глиоксилатного пути, метаболизма органических кислот и превращения двухуглеродных соединений в фотодыхании остаются без ответов. Это связано как со сложностью взаимодействия метаболических путей в клетках и в целых растениях, так и с трудоемкостью самих процессов их изучения. Так, несмотря на значительное количество исследований ферментов аконитатгидратазы (АГ) (КФ 4.1.2.3.) и изоцитратлиазы (ИЦЛ) (КФ 4.1.3.1.), остаются невыясненными многие вопросы, связанные с их ролью в осуществлении координации работы вышеперечисленных метаболических потоков. Субклеточная локализация, изоферментный состав, метаболитная регуляция аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растениях с разным типом основного метаболизма оставались мало изученными. Для решения этих проблем необходимо получение очищенных ферментов, выяснение наличия обратной связи регуляции их активности продуктами катализа, определение генетических детерминант изоферментного разнообразия. Сравнительный анализ локализации и функционирования АГ и ИЦЛ из С3- и С4-растений может пролить свет на функциональные особенности этих ферментов в разных органах растений. Все эти вопросы являются актуальными для выяснения генетических и биохимических основ работы метаболитных циклов растений.

В связи с этим и была поставлена цель настоящей работы: исследование метаболитной и экспрессионной регуляции изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы из кукурузы, сои и амаранта.

Диссертация Н.В. Никитиной построена по традиционному плану. Рукопись объемом 144 страницы включает краткое введение в проблему, которой посвящено исследование, подробный обзор литературы о практически всех аспектах, связанных с изучением свойств АГ и ИЦЛ. Экспериментальная часть работы описывает объекты и методы исследования, результаты и их обсуждение. Диссертацию завершают заключение, выводы и список использованной в диссертации литературы из 208 источников. Иллюстративный материал включает 13 таблиц и 43 рисунка.

**Обзор литературы**, привлечённой диссертантом, охватывает исследования биохимических свойств АГ и ИЦЛ, их ингибиторов и активаторов, разработку методов их очистки. Также затронуты и молекулярные аспекты функционирования этих ферментов: приведены систематизированные данные об известных генах, кодирующих эти ферменты у разных растений, представлены известные данные об особенностях их экспрессии.

**Методическая часть работы** описывает способы измерения активности АГ и ИЦЛ, методы выделения и постадийной очистки этих ферментов, методы определения степени очистки, их внутриклеточной локализации, ингибиторного анализа, а также методы исследования экспрессии соответствующих генов. Методическая часть диссертационной работы Н.В. Никитиной выглядит вполне убедительно. Особое уважение вызывает владение автором трудоемкими методами хроматографической очистки белков до электрофоретически гомогенного состояния. Следует отметить особую заслугу воронежской биохимической школы в деле обучения студентов и аспирантов традиционным методам биохимического анализа, требующим высокой концентрации сил, внимания, аккуратности и скрупулёзности при постановке и проведении экспериментов.

В главе **«Результаты и Обсуждение»** описываются полученные диссертантом экспериментальный материал. В ходе работы автору удалось получить приоритетные результаты и показать следующее:

1. Активность АГ и ИЦЛ в проростках всех исследованных растений (кукуруза, соя, амарант) является результатом работы нескольких изоферментов. Изоферментный состав АГ и ИЦЛ представлен, как правило, двумя молекулярными формами с различной относительной электрофоретической подвижностью.
2. Эти формы ферментов характеризуются разной субклеточной локализацией: Разные формы АГ локализованы в митохондриях и цитоплазме; ИЦЛ – в глиоксисомах и цитоплазме. Такое субклеточное распределение активности исследуемых ферментов обусловлено их физиологической ролью – обеспечением функционирования ЦТК, глиоксилатного цикла, метаболизма органических кислот и превращения двухуглеродных соединений фотодыхания.
3. Получены электрофоретически гомогенные препараты изоферментов АГ и ИЦЛ из кукурузы, сои и амаранта. С помощью очищенных ферментов показано, что АГ ингибируется транс-аконитовой кислотой по принципу обратной связи. Митохондриальный изофермент АГ более чувствителен к транс-аконитату. Активность ИЦЛ сильно ингибируется конечными продуктами глюконеогенеза (глюкозо-1-фосфатом и глюкозо-6-фосфатом).
4. Молекулярно-биологические исследования показали, что изучаемые изоформы АГ и ИЦЛ являются изоферментами, то есть генетически детерминированными белками. Профиль экспрессии генов АГ и ИЦЛ, осуществленный с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени, указывает на его

корреляцию с динамикой аконитазной и изоцитратлиазной активности в прорастающих семенах растений.

К экспериментальной части работы имеется несколько **вопросов и замечаний**:

- На стр. 8 автореферата (Рис. 1) и на стр. 65 диссертации (Рис. 6) идет речь об активности АГ в листья амаранта. Однако, экспериментальные данные представлены только по кукурузе (линия 4 обозначенных рисунков). Данные по изоферментам листа сои и амаранта отсутствуют.

- На тех же рисунках резоннее было бы обозначить маркеры молекулярных масс в кДа, а не показывать границы гелей и фронт красителя. Тем более, что масштаб рисунков приведенных гелей совершенно одинаков.

- При изучении субклеточной локализации АГ и ИЦЛ (Табл. 1 автореферата и Табл. 5 диссертации), вероятно, в качестве контроля можно было бы привести данные по хлоропластам. Тем более, что эксперименты по разделению клеточных фракций и органелл так или иначе проводились.

- Результаты выделения суммарной клеточной РНК (Рис. 37 диссертации, стр. 110) выглядят нечетко. Очевидно, следовало бы использовать 1,2% агарозный гель в неденатурирующих условиях или проводить анализ в формальдегид-содержащем геле.

- В диссертации отсутствуют данные о попытках идентифицировать природу амплифицированных фрагментов (Рис. 41) путем секвенирования. Без этих данных (даже при амплификации с использованием строго специфичных праймеров) интерпретация результатов анализа не кажется 100% убедительной.

Итоги экспериментальной части диссертационной работы подведены в **Заключении** (3 страницы), где суммированы полученные в работе данные и приведена гипотетическая схема метаболической и экспрессионной регуляции функционирования обнаруженных изоферментов АГ и ИЦЛ (Рис. 7 автореферата и Рис. 43 диссертации).

Завершают диссертацию девять **выводов**, в которых отражена фундаментальная значимость исследования. Выводы вполне согласуются с задачами, стоявшими перед диссертантом, и основаны на результатах большого числа проведенных экспериментов.

Оценивая диссертацию М.В. Никитиной в целом, следует подчеркнуть, что это оригинальное законченное научно-квалификационное исследование, в котором получены новые данные о молекулярных формах ферментов АГ и ИЦЛ, их локализации и регуляции в клетках растений.

Поставленная диссертантом цель, несомненно, актуальна, а полученные результаты обладают высокой степенью научной новизны. Работа выполнена на высоком методическом и теоретическом уровне, достоверность результатов не вызывает сомнения, а выводы автора полностью соответствуют результатам, полученным в ходе экспериментов. Результаты работы в исчерпывающем виде представлены в автореферате. Основные результаты диссертационного исследования, полученные лично соискателем, опубликованы в одной статье в центральном рецензируемом издании (*Успехи современной биологии*), одной статье в Вестнике Воронежского Государственного университета, восьми статьях в сборниках, четырех тезисах, а также доложены на различных научных конференциях. Три из четырнадцати работ опубликованы в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК.

Новые сведения, полученные в работе М.В. Никитиной, могут быть использованы в биологических, сельскохозяйственных, биотехнологических научных институтах, а

также в университетских программах подготовки студентов и аспирантов по физиологии и биохимии растений, в частности, на биолого-почвенном факультете ВГУ при чтении лекций по курсам «Физиология растений», «Биохимия», а также спецкурсам «Молекулярная биология», «Энзимология», «Метаболизм органических кислот».

Таким образом, диссертационная работа М.В. Никитиной «Метаболитная и экспрессионная регуляция аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активности в растениях с разным типом метаболизма» по теоретическому уровню, объёму проведённых исследований, научной новизне и практической значимости отвечает критериям, сформулированным в п. 9 Раздела II «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а автор работы, Марина Викторовна Никитина, заслуживает присуждения ей учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Диссертация и отзыв обсуждены на совместном заседании лабораторий молекулярных основ внутриклеточной регуляции, управляемого фотобиосинтеза, и мембран растительных клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук 21 ноября 2014 года.

Зав. Лабораторией молекулярных основ  
внутриклеточной регуляции  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки  
Института физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук  
Доктор биологических наук  
Профессор




Лось Дмитрий Анатольевич

24 ноября

Лось Дмитрий Анатольевич  
ИФР РАН  
Ботаническая ул. 35  
127276 г. Москва, РФ  
e-mail: losda@ippras.ru  
тел. +7-499-9779372

ПОДПИСЬ Лось Д.А.  
ЗАВЕРЯЮ  
ЗАВ. ОТД. КАДРОВ  
Газымова Е.Г.  
Лось



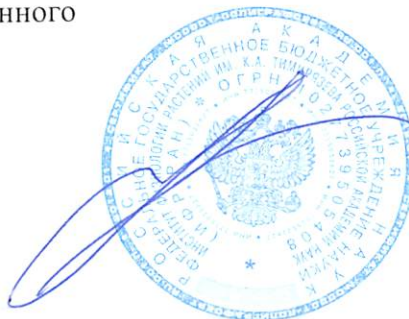
## ПРИЛОЖЕНИЕ №1

Список 10 трудов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, относящихся к теме рецензируемой диссертации (М.В. Никитина «Метаболитная и экспрессионная регуляция аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активности в растениях с разным типом метаболизма»). Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

1. **Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Воронин П.Ю., Оельмюллер Р., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н.** (2014) Мембранные рецепторы цитокинина и их регуляторная роль в адаптации растений *Arabidopsis thaliana* к фотоокислительному стрессу на фоне водного дефицита. *Физиология растений* 61, 466-475.
2. **Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I.** (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynthesis Research* 116, 489-509.
3. **Krylova V.V., Andreev I.M., Zartdinova R.F., Izmailov S.F.** (2013) Biochemical characteristics of the Ca<sup>2+</sup> pumping ATPase in the peribacteroid membrane from broad bean root nodules. *Protoplasma* 250, 531-538.
4. **Белозерова Н.С., Банк А.С., Буцанец П.А., Кузнецов В.В., Шугаев А.Г., Пожидаева Е.С.** (2013) Влияние салициловой кислоты на альтернативный путь дыхания люпина желтого (*Lupinus luteus* L.). *Физиология растений* 61, 43-52.
5. **Шевырева Т.А., Пиотровский М.С., Белугин Б.В., Жесткова И.М., Трофимова М.С.** (2013) Использование голубого нативного электрофореза для выявления белковых комплексов плазмалеммы, содержащих РІР-аквапорины. *Физиология растений* 60, 596-603.
6. **Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В.** (2012) Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений. *Физиология растений* 59, 163-178.
7. **Андреев И.М.** (2012) Роль вакуоли в редокс-гомеостазе растительных клеток. *Физиология растений* 59, 660-667.
8. **Генерозова И.П., Шугаев А.Г.** (2012) Дыхательный метаболизм митохондрий проростков гороха разного возраста в условиях недостатка влаги и переувлажнения. *Физиология растений* 59, 262-273.
9. **Шугаев А.Г., Лаштабега Д.А., Шугаева Н.А., Выскребенцева Э.И.** (2011) Активность антиоксидантных ферментов в митохондриях растущих и покоящихся корнеплодов сахарной свеклы. *Физиология растений* 58, 323-329.
10. **Белозерова Н.С., Пожидаева Е.С., Шугаев А.Г., Кузнецов В.В.** (2011) Метод *run-on* транскрипции для изучения регуляции экспрессии митохондриального генома. *Физиология растений* 58, 133-138.

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института физиологии  
растений им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук  
чл.-корр. РАН

24 ноября 2014 г.



Вл.В. Кузнецов