

Отзыв официального оппонента к.б.н. О.В. Войцеховской
на диссертационную работу Гатауллиной Марины Олеговны
«ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ
В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ»

по специальности 03.01.04 – «Биохимия»,

представленную к защите 27 апреля 2021 г. в диссертационном совете Д 212.038.03 при
Воронежском государственном университете по адресу: 394036, Воронеж,
Университетская пл., 1.

Реакции превращения малата представляют собой важнейшую часть метаболизма живой клетки. Однако особую роль эти реакции играют в растительной клетке. Это обусловлено сложной компартментацией метаболизма в клетках растений и необходимостью обмена восстановленными эквивалентами между различными органеллами клетки, что происходит, как правило, с помощью «малатных переносчиков», и, кроме того, необходимостью транспорта первично фиксированной углекислоты из клеток мезофилла в клетки обкладки сосудистого пучка у растений, осуществляющих фотосинтез по С4-пути. Физиологические роли реакций окисления и декарбоксилирования малата многообразны, и это отражено в существовании у растений целого арсенала малатдегидрогеназ, различающихся механизмом катализируемой реакции, специфичностью к пиридиновым нуклеотидам и субклеточной локализацией. В то же время, к настоящему времени для растений нет описания на молекулярном и на биохимическом уровнях всего комплекса ферментов окислительного метаболизма малата, функционирующих в листьях (либо других органах). Поэтому тема диссертационной работы Марины Олеговны Гатауллиной весьма **актуальна**. Выполненное ею исследование было призвано впервые дать биохимическую и молекулярную характеристику всех обнаруженных изоформ малатдегидрогеназного комплекса с различной внутриклеточной локализацией для С4-растения. Автор справилась с поставленной задачей.

Для достижения поставленной цели автором был использован ряд современных методов биохимии, физиологии и молекулярной биологии. Диссертационная работа отличается **существенной теоретической значимостью**, оригинальностью и **новизной**, 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; в этом состоит **практическая значимость** работы.

Диссертация состоит из Введения и двух глав – «Обзор литературы» и «Экспериментальная часть»; вторая глава включает разделы «Цель и задачи исследования», «Объекты и методы исследования», «Результаты и их обсуждение». Кроме того, диссертация содержит Заключение, Выводы и Список литературы, который включает 168 источников. Диссертация изложена на 128 страницах, включая 44 рисунка и 7 таблиц; диссертация также имеет Приложение, в котором содержится 52 рисунка и 6 таблиц. Диссертацию предваряет список сокращений, использованных

автором. Во Введении автором подчеркивается наличие большого числа изоформ ферментов малатдегидрогеназной системы в клетке растений, отсутствие в литературе полноценной биохимической и молекулярной характеристики малатдегидрогеназной системы для какого-либо модельного растительного организма, а также отсутствие исследований роли метилирования ДНК в регуляции уровня экспрессии генов, кодирующих малатдегидрогеназы. Во Введении автор формулирует **цель** диссертационной работы как изучение физико-химических и каталитических характеристик изоформ ферментов малатдегидрогеназной системы растений и молекулярно-генетических механизмов их функционирования. Во Введении также логично обосновываются **задачи** (7 задач), решение которых позволяет достичь поставленную диссертантом цель исследования.

Обзор литературы включает 37 страниц, он логично построен и разбит на четыре раздела. В первом разделе автор рассматривает биохимические и регуляторные характеристики известных к настоящему времени малатдегидрогеназных ферментов из широкого круга растительных объектов. Второй раздел посвящен анализу современных знаний о регуляции ферментов малатдегидрогеназной системы растений на уровне экспрессии кодирующих их генов. В третьем разделе рассмотрены эпигенетические механизмы регуляции активности генов; здесь приведена также краткая характеристика современных методов, используемых для анализа уровня метилирования промоторов генов интереса, и суммированы имеющиеся к настоящему времени немногочисленные данные об участии метилирования промоторов в регуляции генов, кодирующих компоненты малатдегидрогеназной системы растений. Четвёртый раздел посвящен анализу физиологической роли каждого компонента малатдегидрогеназной системы в растениях при различных стрессовых воздействиях.

Несмотря на логичное построение обзора литературы, которое полностью соответствует поставленной цели и задачам и показывает хороший научный кругозор автора, к нему имеется ряд замечаний. Обзор написан крайне сложными фразами, во многих случаях угадывается «калька» с английского языка: например, автор пишет о «фасоли касторовой» (стр.17), но на самом деле имеется в виду клещевина *Ricinus communis* (castor bean по-английски) – растение семейства не бобовых, как фасоль, а молочайных. Видимо, так же объясняется использование автором терминов «озеленение семядолей», «секвенирование взрослого растения», «фотореспирация», а также выражений типа «метилирование может быть репрессивным к транскрипции» (стр. 26). К сожалению, подобное небрежное отношение к описанию как литературных, так и собственных данных, присуще всей диссертационной работе в целом. Для рецензента осталось непонятным, что имеет в виду автор под «нефосфорилирующей респираторной электрон-транспортной цепью, которая способствует синтезу АТФ» (стр.39)? Если имеется в виду альтернативный путь дыхания с участием альтернативной оксидазы, то он не связан с синтезом АТФ. Однако, в целом обзор литературы оставляет очень хорошее и основательное впечатление, и можно было бы только пожелать, чтобы автор заключила его небольшим резюме, из которого бы в том числе ясно следовало, насколько важны и своевременны поставленные ею в работе цели и задачи в свете проанализированных ею литературных материалов.

Глава «Экспериментальная часть» состоит из трех разделов, при этом раздел «Цель и задачи исследования» полностью повторяет текст того же раздела во Введении. Раздел «Объекты и методы исследования» даёт описание спектра методов, использованных для решения поставленных задач. Он весьма впечатляет, а также показывает высокий уровень эрудиции автора, её способность ориентироваться в разных областях науки о растениях и интегрировать полученные данные в целостную картину. Все выбранные методы адекватны поставленным задачам. Однако, к описанию самих методов имеются замечания.

В первую очередь, это отсутствие полных и подробных протоколов для выделения и очистки ферментов – метода, с помощью которого стало возможным получение основных результатов данной работы. Если данный метод был где-то подробно опубликован, то автору следовало, по крайней мере, сослаться на данную работу. Не указано, каким был спектральный состав света, при котором выращивались растения кукурузы. При описании метода получения фракции пероксисом автор опустила ряд критически важных подробностей. Не указано, каковы были температурные условия каждого этапа. Проводилась ли гомогенизация растительного материала и последующие этапы на льду? Поскольку именно с помощью разработанной автором методики очистки пероксисомальной фракции ей удалось впервые охарактеризовать особую форму малатдегидрогеназы с пероксисомальной локализацией, то очевидно, что для этого потребовалось выделить именно цитологически интактных пероксисом. В проведенном протоколе автор даёт значения концентрации сахарозы, при которых из градиента выделяли фракцию интактных пероксисом, но не указывает, каким образом контролировали их интактность. Обычно в подобных случаях выполняется анализ градиентных фракций с помощью трансмиссионной электронной микроскопии; был ли проведен этот анализ? Если нет, то откуда вытекает уверенность автора, что фракция, с которой она работала, действительно содержит интактные пероксисомы, а не частично разрушенные, для которых увеличивается вероятность загрязнения другими органеллами, содержащими малатдегидрогеназы?

При описании синтеза кДНК на основе РНК автор не указывает, проводился ли контроль чистоты РНК от загрязнения геномной ДНК - например, ПЦР с праймерами к убиквитину с использованием выделенного препарата РНК в качестве матрицы? При описании метода ПЦР в реальном времени, использованного для количественной оценки уровней экспрессии генов, автор не указывает, на каком основании было выбрано количество циклов 35. Также остается неясным, учитывалась ли при расчетах эффективность использованных для каждого гена праймеров. Учет эффективности может изменить оценку уровня экспрессии, т.е. кажущаяся разница в уровнях экспрессии изучаемых генов может исчезнуть при введении учета эффективности прайминга. Далее, в описании эксперимента по изучению влияния спектрального состава света на малатдегидрогеназную систему после указания светового диапазона для использованных светодиодов автор пишет: «данная интенсивность света достаточна для возникновения сигнальных реакций... но не приводит к интенсификации протекания фотосинтеза». Однако, не указано, какова же была интенсивность света, падающего на растения при освещении их светодиодами, каким

прибором она была измерена, и на основании чего автор сделал вывод, что при этом не было влияния на фотосинтез кукурузы? Автор указала, что проводилась статистическая обработка результатов, но нигде на рисунках и в таблицах не указано, в каких случаях различия статистически достоверны, а в каких – нет; также не сказано, что именно отражает показанный на графиках разброс – ошибку среднего? стандартное отклонение выборки? Хотелось бы пожелать автору обратить серьезное внимание на то, что даже самые очевидные «на глаз» различия не являются доказанными, если не были применены адекватные статистические методы оценки значимости этих различий, результаты которой следует отразить на рисунках и в таблицах.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из четырех подглав. Результаты, полученные диссертантом, полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Большинство из них получено впервые.

Первая часть результатов (подглава 2.3.1) очень важна для всей работы, так как от неё зависит в значительной мере интерпретация других полученных данных. Проанализированы изоферментный состав и субклеточная локализация компонентов малатдегидрогеназной системы кукурузы. Большое интерес и высокую научную ценность представляют результаты, демонстрирующие наличие в растительной клетке особой пероксисомальной формы НАД⁺-малатдегидрогеназы. Для всех идентифицированных ферментов автором впервые был определён субъединичный состав, сродство к субстратам и коферментам, а также оптимумы pH. Проведенное исследование влияния на активность компонентов малатдегидрогеназной системы различных ионов металлов позволило автору впервые показать, что, в отличие от ранее установленного активирующего действия марганца на малик-энзимы, ионы марганца оказывают ингибирующее влияние на оксидоредуцирующие малатдегидрогеназы. Данный факт позволяет разработать методики раздельного определения активностей обеих групп ферментов в одной фракции.

Подглава 2.3.2. описывает результаты выявления с помощью биоинформатического анализа в геноме кукурузы генов, кодирующих компоненты малатдегидрогеназной системы. Восемь генов были исследованы на предмет возможности регуляции их экспрессии по механизму метилирования промоторных областей. Сначала с помощью специального исследования в промоторах всех этих генов автором были обнаружены потенциальные участки высокого метилирования. Далее для ответа на вопрос, играет ли метилирование промоторной области ДНК роль в регуляции экспрессии данных генов, автор проводила сравнение уровней метилирования и уровней экспрессии генов интереса. Это сравнение было выполнено в условиях различной активации фитохромной и криптохромной системы растений путем воздействия светом разного спектрального состава (подглава 2.3.3). Предварительно автором было показано, что уровень активности изучаемых ферментов изменяется в зависимости от длины волны света, которым предоблучали растения, что подтвердило потенциальную пользу данной экспериментальной системы для решения поставленной задачи. Автором убедительно продемонстрировано, что для двух генов – *cyt-mdh2* и *nadp-me* - уровень транскрипции и уровень метилирования промоторов имеют противоположную динамику, что с высокой вероятностью означает участие метилирования ДНК в регуляции данных генов.

Затем роль эпигенетической регуляции генов, кодирующих компоненты малатдегидрогеназной системы, в адаптации растений к стрессам была исследована в условиях воздействия на растения недостатком кислорода. Автор использовала гипоксические условия, максимально близкие к аноксии: растения кукурузы экспонировали в газообразной среде, где содержание кислорода не превышало 1 %. В связи с этим представляется более корректным называть данное стрессовое воздействие аноксическим, а не гипоксическим. Исследовалось влияние атмосферы азота, а также углекислого газа, на ферментативную активность, на уровень экспрессии генов ферментов малатдегидрогеназ, и на степень метилирования их промоторных участков. Несмотря на выраженные изменения двух первых параметров, недостаток кислорода не оказывал влияния на метилирование промоторов изученных генов.

В заключении автор суммирует полученные результаты и интерпретирует их с точки зрения ответа энергетического метаболизма растений кукурузы на изменения светового режима и на анаэробные условия. Можно согласиться с автором с её заключением о первостепенной функции малатдегидрогеназной системы как системы, обеспечивающей адаптации клеточного метаболизма, в первую очередь энергетического, на уровне различных клеточных органелл к внешним условиям, а также об участии эпигенетического механизма изменения статуса метилирования промоторных областей генов, кодирующих компоненты малатдегидрогеназной системы, в регуляции этой системы. На Рисунке 44 приведена схема, которая наглядно иллюстрирует интерпретацию полученных автором результатов.

Несмотря на высказанные в отзыве замечания, сделанные автором в работе выводы можно считать вполне обоснованными. К выводам можно сделать лишь одно замечание, а именно, автор указывает, что была определена экзон-интронная структура изученных генов, но в диссертации не приводятся эти данные. Кроме того, непонятно, были ли депонированы в системе Genbank проанализированные автором последовательности промоторов генов интереса? Если нет, то очевидно, что это следует сделать. Замечания не умаляют научной значимости диссертационной работы и не снижают произведённого общего впечатления от выполненного исследования. Хочу ещё раз обратить внимание на хороший методический и теоретический уровень выполнения работы и высокую научную ценность полученных автором результатов. Они открывают перспективы для исследований сразу по нескольким направлениям.

К оформлению диссертации имеется ряд замечаний. В тексте имеется большое количество опечаток. Нумерация таблиц при их описании в тексте не соответствует номеру таблицы на протяжении всего раздела «Результаты и обсуждение» («Табл. 3» в тексте следует читать «Табл. 4» и т.д.). На рисунках, где одновременно приводятся данные по уровню экспрессии генов и уровню метилирования их промоторов (рисунки 19-23, 25, 27-29, 32-36), отсутствуют подписи рядов данных. Но все перечисленные неточности не влияют на изложение материала и сделанные автором выводы. Автореферат диссертации Гатауллиной М.О. полностью отражает содержание диссертации. Материалы диссертационной работы неоднократно докладывались на Всероссийских и международных конференциях. По теме диссертации автором опубликовано семь научных статей в журналах, рекомендованных ВАК, которые вполне отражают результаты, полученные автором в ходе ее работы над диссертацией.

Однако, можно ожидать, что за этими статьями последуют еще публикации, так как выполненное исследование определенно имеет высокий научный и «публикационный» потенциал.

Оценивая работу в целом, можно заключить, что по объёму проведённых исследований, по научной значимости полученных результатов, по разнообразию и адекватности применённых методов исследования, диссертационная работа Гатауллиной М.О. представляет собой завершённое, важное и интересное исследование. Написанная диссертация 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 специальности 03. 01. 04 - «Биохимия». Марина Олеговна Гатауллина заслуживает присуждения этой степени.

08 апреля 2021 г.

Ольга Владимировна Войцеховская
Кандидат биологических наук,
зав. лабораторией экологической физиологии
ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова
Российской академии наук
197376 Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, 2
(812) 372-54-00
ovoitse@binran.ru

/О.В.Войцеховская/

Войцеховская

*Подпись заверяю
Директор БИИ РАН
Дмитрий
А.В. Тельман*

Подпись руки
ЗАВЕРЯЮ

Войцеховской О.В.
См. список ОК
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук

