



«УТВЕРЖДАЮ»

директор Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

чл.-корр. РАН

Д.А. Лось

«15» _____ 2021г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию

Гатауллиной Марины Олеговны на тему: «ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Ферменты малатдегидрогеназной системы участвуют во многих важных метаболических процессах растительной клетки (темновое дыхание, C4 фотосинтез, фотодыхание, глиоксилатный цикл), обеспечивают транспорт восстановителей через мембрану митохондрий и пероксисом. Функционирование малатдегидрогеназной системы имеет большое значение для осуществления адаптивных реакций клеточного метаболизма в стрессовых условиях. Изучение механизмов работы малатдегидрогеназной системы необходимо для понимания функционирования основных энерготрансформирующих процессов в растительной клетке, а также для создания модифицированных сортов растений с повышенной экспрессией генов, позволяющих адаптировать растение к неблагоприятным условиям.

Целью данной работы явилось изучение физико-химических и каталитических характеристик изоформ ферментов малатдегидрогеназной системы растений и молекулярно-эпигенетических механизмов их функционирования в нормальных и стрессовых условиях. Научная проблема, сформулированная в диссертации, является важной и актуальной, поскольку на сегодняшний день возникла явная необходимость комплексного системного взгляда на малатдегидрогеназы и малик-энзимы растительной клетки как целостную взаимосвязанную систему. Получение гомогенных препаратов разных изоформ данных ферментов позволило диссертанту исследовать их физико-химические, регуляторные свойства и особенности структурной организации. Использование методов геномики и биоинформатики позволило выявить наличие CpG-островков в промоторах генов, кодирующих ферменты малатдегидрогеназного комплекса. Это дало возможность исследовать регуляцию их экспрессии в экстремальных условиях с помощью эпигенетических механизмов. В частности, установлено влияние метилирования CG-динуклеотидов промоторов генов *nadf-me* и *cyt-mdh2* в листьях растений при смене светового режима. Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов малатдегидрогеназных генов, впервые проведенный в работе, позволил подобрать метил-специфичные праймеры, которые можно использовать в

дальнейших научных исследованиях при изучении эпигенетического контроля за функциональным состоянием ферментных систем.

Диссертация Гатауллиной М.О. является оригинальным завершённым научным исследованием, в ее основу положены результаты собственных исследований диссертанта.

Основные положения диссертации нашли отражение в публикациях автора. По материалам диссертации автором опубликованы 19 публикаций – тезисы и статьи, среди которых 7 статей, опубликованы в журналах, включенных в список ВАК.

Структура диссертации достаточно традиционна, работа изложена на 143 страницах машинописного текста. Она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (164 источника из них 141–зарубежных). Иллюстрационный материал включает 44 рисунка и 8 таблиц.

Первая глава диссертации представляет обзорное введение в проблему, дана общая характеристика ферментов малатдегидрогеназной системы растений, их физико-химические свойства и регуляторные характеристики. Рассмотрены эпигенетические механизмы регулирования, их виды, методы анализа, а также роль эпигенетики в адаптации растений к стрессам. Приведенный автором анализ позволяет составить представление по кругу рассматриваемых в диссертации проблем. Глава написана хорошим языком и отражает современные научные достижения по теме диссертации.

Однако, есть и замечания. Обзор литературы содержит избыточное количество устаревших ссылок (за 1970-1980 годы) (ссылки 70, 82, 91, 133 и др.). При описании физико-химических свойств и регуляторных характеристик пероксисомальных, митохондриальных, цитозольных МДГ (стр. 17-19) чрезмерно используется одна ссылка 1992 г. (ссылка 76, Gietl C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1992). Недоумение вызывает фраза на стр. 35: «В настоящее время...» при этом используется та же ссылка почти 30-летней давности (76). Такое активное использование данной ссылки привело к ошибочным утверждениям (стр.36), а именно: «До сих пор не было зарегистрировано мембраносвязанных транслоказ для микротелец. Микротельца, безусловно, являются компартментами для ферментов, но пока неизвестно, являются ли субстраты компартментализированными, что потребовало бы контроля мембранными транспортными системами [76]». Известно, что на мембране глиоксисом имеются порообразующие белки, которые участвуют в переносе метаболитов глиоксилатного цикла. Кроме того, два фермента этого биохимического пути (МДГ и аконитаза) локализованы в цитозоле (M. Kunze, I. Pracharoenwattana, S. M. Smith, A. Hartig A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763 (2006) 1441–1452; Pracharoenwattana I, Smith SM. When is a peroxisome not a peroxisome? *Trends Plant Sci*. 2008 (10):522-5. doi: 10.1016/j.tplants.2008.07.003; Kunze M, Hartig A. Permeability of the peroxisomal membrane: lessons from the glyoxylate cycle. *Front Physiol*. 2013; 4:204. doi: 10.3389/fphys.2013.00204).

В литературном обзоре в ряде случаев приводятся интересные литературные данные, при этом ссылки на авторов отсутствуют, например: стр. 14 (2 абзац), стр.

20 (3 абзац), стр. 29 (2, 4 абзацы), стр. 37 (последние абзацы), стр. 39. (2 абзац), стр. 42 (1 абзац) и т.д.

Встречается неточность использования ссылок, например, на стр.38-39 автор использует одну ссылку (162, Yao Y. X. et al. The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses //Plant physiology and biochemistry. – 2011. – Т. 49. – №. 3. – С. 257-264), при этом в тексте в одном случае сообщается, что исследования проводили на *Arabidopsis*. (стр.38), а в другом на винограде (стр.39).

В главе 2.2 «Объекты и методы исследования» дано описание использованных методических подходов. В экспериментальной работе авторы использовали достаточно широкий спектр современных методов. Вместе с тем глава 2.2 содержит некоторые недостатки и опечатки. В частности, нигде не указана температура, при которой проводились все процедуры по выделению и очистке ферментов!

Стр. 52. Раздел 2.2.1 «Объекты исследования». «В качестве объектов исследования в работе использовали листья кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом при 10-ти часовом световом дне, температуре 25оС и интенсивности света 25 Вт/м²). Не указан состав питательной среды. Почему использовали низкий уровень освещения?

Стр. 53. «Общее количество белка, который содержится в пробах, определяли по методу Лоури (Lowryetal., 1951) [98], основанному на воздействии щелочного раствора сульфата меди (биуретовая реакция), вольфрамата и молибдата натрия (реакция Фолина на тирозиновые и цистеиновые радикалы) на белок, образуются комплексные окрашенные соединения. Оптическая плотность растворов определяется на **спектрофотометрически** (опечатка!) при длине волны 750 нм». Не понятно, как рассчитывали концентрацию белка. По калибровочному графику, по формуле? Какой белок использовали в качестве стандарта? Это важно, поскольку метод Лоури очень специфичен к составу белка. Этот метод является сочетанием двух реакций: биуретовой реакции (по пептидной связи) и реактива Фолина, который оригинально предназначен на определение ароматики в фенольных соединениях. В белках он реагирует с аминокислотными остатками тирозина, триптофана и цистеина. Таким образом, количественное определение белка зависит от содержания в белке этих аминокислот.

Стр. 54. «Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25 (Pharmacia, Швеция). Элюцию осуществляли 0,1 М соответствующими TrisHCl-буферами в зависимости от очищаемого фермента, со скоростью 15-20 мл в час». Какой размер колонки? Скорость элюции без указания размера колонки ничего не дает! Какое количество белка вносили в колонку?

Стр. 54. «Хроматография на ионообменнике DEAE-Sephacel (“GeneralElectronicsHealthcareBioscience”, Швеция). В качестве элюента был использован линейный градиент NaCl с концентрациями от 0 до 250 мМ [15]». Необходимо было указать размер колонки, состав буфера, скорость проведения хроматографии. Какое количество белка вносили в колонку?

Стр. 55. 2.2.6.2 Определение гомогенности ферментных препаратов. Для определения гомогенности белков обычно используют окрашивание кумасси, при этом в гель вносят ряд разбавлений препарата, начиная от явной перегрузки геля до предела чувствительности метода. В этом случае можно рассчитать степень чистоты препарата. Окраска серебром – весьма специфична и не обладает стехиометрией, поэтому для определения чистоты белковых препаратов не очень используется.

Стр. 56. 2.2.6.4 Определение молекулярной массы субъединиц. «Определение молекулярной массы субъединиц исследуемых ферментов осуществляли методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmly, 1970) [36]. Детергентная система включала следующие компоненты: разделительный гель – 2,5% акриламид, 0,4 М трис-НСI-буфер, рН 8,8; 10% додецилсульфат натрия; 10% персульфат аммония; 0,025% N,N,N',N' - тетраметилэтилен диамин; концентрирующий гель – 6% акриламид; 400мМ трис-НСI-буфер, рН 6.8; 10% ДДС; 0,025% ТЕМЕД и 10% персульфат аммония. Электродный буфер содержал 0,01 М трис-НСI; 1% додецилсульфат натрия; 0,192 М глицин; рН 8,3». Диссертантка указала сток-растворы, но не конечные концентрации растворов.

Стр. 56-57. 2.2.7 Определение молекулярной массы нативных ферментов. Нет никаких данных о параметрах проведения хроматографии. Сефадекс G-200 (тем более суперфайн!) Здесь должны быть указаны и параметры колонки, и скорость элюции, и количество, и объем наносимой фракции белка, а также калибровка колонки. Имеется ссылка на формулу определения мол. масс (Детерман, 1970). В формуле имеются два коэффициента: откуда они взялись?

В целом результаты, полученные диссертантом, вполне обоснованы и достоверны, однако и в этом разделе есть замечания.

На стр. 10 диссертации (и стр. 4 автореферата) в разделе «Научная новизна и значимость работы». «...для *nadf-me* установлена четкая зависимость между уровнем транскриптов и статусом метилирования отдельных CG-динуклеотидов. Высокий метильный уровень промоторов этих генов приводит к снижению содержания транскриптов генов НАД⁺-зависимых малик-энзимов». Непонятно о каких малик-энзимах идет речь - НАДФ⁺- или НАД⁺-зависимых?

На стр. 66, (и стр. 13 автореферата) Раздел 2.3.1.2. «Получение в гомогенном состоянии различных малатдегидрогеназ из мезофилла листьев кукурузы». Почему только в клетках мезофилла? Кукуруза, как C4 вид, характеризуется кооперативным типом фотосинтеза, т.е. особый интерес представляют клетки обкладки, в хлоропластах которых и локализован НАДФ-МЭ.

На стр. 86 диссертации, последний абзац (а также в автореферате стр. 14, 2-й абзац): «Однако ген первой цитоплазматической изоформы МДГ (рис. 19) увеличивает экспрессию в темноте и при облучении красным светом, ...». Но на рис. 19 значимого увеличения относительного уровня транскриптов при облучении красным светом не наблюдается.

В заключительном разделе диссертации подведены итоги проведенной автором комплексной работы. Автором разработана и представлена интересная «Гипотетическая схема субклеточной локализации функционирования различных изоферментов МДГ в мезофилле листьев кукурузы и регуляция их активности при смене светового режима» (стр. 107. рис. 44). На схеме обобщены основные результаты, полученные диссертантом, однако в названии указано, что рассматривается функционирование различных изоферментов МДГ в мезофилле листьев кукурузы, тогда как на схеме представлен фермент НАДФ-МЭ, который локализован в хлоропластах клеток обкладки проводящих пучков.

Выводы, сделанные автором, обоснованы и соответствуют полученным результатам.

Вместе с тем диссертационная работа содержит значительное количество опечаток. Практически на каждой странице текста диссертации и автореферата

встречается отсутствие пробелов между словами, а на некоторых страницах по несколько раз (стр.32, 39 диссертации и т.д.).

Список литературы составлен небрежно и не соответствует предъявляемым требованиям: в ссылках: 18, 24, 27 не указаны издательство, город и количество страниц. В ссылках 39, 42, 76, 79, 138 не указан год, № журнала, страницы. В ссылках 1, 21, 22, 23, 25, 35, 39, 50, 54, 65, 69, 77, 88, 93, 118, 122, 151, 155, 163 не указаны страницы. Ссылки, приведенные на стр. 62 (Ллойд, Ледерман, 1989; Лакин, 1990; Чернышев, Стариков, 1998), в списке литературы отсутствуют.

Несмотря на достаточно большое количество отмеченных недостатков, в целом они не носят принципиального характера и не умаляют значимости диссертационной работы.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Однако, в разделе «Актуальность проблемы» автореферата диссертант не приводит ссылок (все-таки данные ферменты давно и основательно изучаются), а также желательно было указать более подробно какие физиологические функции данные ферменты выполняют в растениях.

На стр. 13 автореферата при описании найденных в международной базе данных GenBank 2019 генов, в большинстве случаев даны Gene ID и только в 2-х случаях название генов. Желательно было указать названия всех генов, тем более они активно используются в дальнейшей работе.

На стр.15 «Для обеих митохондриальных изоформ характерно увеличение транскрипции их генов в темновых условиях (рис. 5), что может быть связано с участием МДГ в интенсифицирующемся цикле Кребса». Однако на рис.5 не показано увеличение транскрипции генов *m-mdh2* в темновых условиях. Вероятно, это можно объяснить тем, что вместо рис. 5 вставили рис.6, поскольку рис.5 и рис.6 – в автореферате одинаковые. В тоже время в диссертации на рис.21 и 22, стр. 88-89 показан относительный уровень транскриптов генов *m-mdh1* и *m-mdh2* и они значительно отличаются от рис.5 в автореферате.

На стр. 17 при описании рис. 8 автор пишет: «... при вытеснении кислорода углекислым газом цитоплазматические формы ингибируются на протяжении суток с момента начала эксперимента...», однако это не соответствует данным на рис.8. При сравнении рис.8 с аналогичными рисунками в диссертации на стр.96, рис. 30 и 31 становится очевидным, что в автореферате неправильно подписаны условия инкубации в углекислом газе и азоте.

На стр.18 рис. 9 «Экспрессия *mtx-mdh1* в листьях кукурузы в условиях гипоксии и степень метилирования CpG-островков». Непонятно почему митохондриальная МДГ здесь обозначена как *mtx-mdh* в других случаях она обозначается как *m-mdh*.

На стр.23 представлен рис. 17 «Гипотетическая схема...», но на самом деле этот рисунок должен быть рис. 16. При этом в тексте на стр.22 этот рисунок обозначен как рис. 45.

Резюмируя содержательную часть диссертационной работы «ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ», можно заключить, что диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно, полученные современными и адекватными методами данные достоверны и репрезентативны, выводы подтверждены полученными данными и обоснованы, диссертационная работа написана доходчиво,

грамотно и вполне соответствует требованиям, пунктов 9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Рахманкулова Зульфира Фаузиевна



Доктор биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории глобальной экологии фотосинтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Тел. 8-903-666-8920
zulfirar@mail.ru

Мошков Игорь Евгеньевич



Доктор биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений, ведущий научный сотрудник лаборатории зимостойкости Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Тел. 8-916-204-7005
ie.moshkov@mail.ru

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании лаборатории глобальной экологии фотосинтеза

протокол № 3 от «11» марта 2021 г.

Рахманкуловой З. Ф., Мошкова И. Е.

ПОДПИСА
РАХМАНКУ
ЗУЛЬФИРА

15 марта 2021



Мошкова И. Е.

Мошкова И. Е.

