

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию  
Федорина Дмитрия Николаевича «Биохимические и молекулярные механизмы  
фитохром-зависимой световой регуляции функционирования ферментов  
метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях», представленную на  
соискание ученой степени доктора биологических наук  
по специальности «1.5.21 – Физиология и биохимия растений»

### **Актуальность темы выполненной работы**

Метаболизм высших растений, обладающих сложной системой взаимосвязанных биохимических процессов, представляет чрезвычайный интерес для изучения. В процессе развития растения претерпевают изменение основного метаболизма, переходя от гетеротрофного типа питания и использования запасных веществ семени к автотрофному, где центральную роль в получении питательных веществ выполняет фотосинтез. Во время этого перехода паттерны экспрессии многих генов изменяются различными способами. Роль цикла Кребса, обеспечивающего клетку веществами и энергетическими эквивалентами в процессе прорастания семян, в условиях света состоит в регуляции окислительно-восстановительного баланса, а также в продуцировании метаболитов для анаболических реакций и АТФ в качестве источника энергии.

Таким образом, важное значение представляют эпигенетические и энзиматические механизмы регуляции дыхательного метаболизма и особый интерес вызывает исследование влияния освещенности на переключение энергетического метаболизма и анаболического обмена в растительной клетке, поскольку, свет — это сигнал окружающей среды, который, помимо обеспечения энергией для фотосинтеза, служит пусковым механизмом и модулятором сложных регуляторных механизмов. Под воздействием света фитохромной системой кукурузы регулируются паттерны экспрессии генов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы. Исследования эпигенетических и молекулярных механизмов регуляции активности ферментов дыхательного метаболизма при адаптации растительного метаболизма к стрессовым факторам позволяют получить данные, необходимые для создания современной научной концепции, объясняющей механизмы адаптивной реакции клеточного метаболизма к стрессорам различной природы, а также необходимо выяснить роль и значение индикаторных показателей функциональной активности дыхательного метаболизма фитохромной системы при разной освещенности.

В связи с этим работа Д.Н. Федорина, посвященная выяснению биохимических и молекулярных механизмов фитохром-зависимой регуляции

изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях, включающая возможности их практического использования, является вполне актуальной как в научном, так и в практическом аспектах.

### **Структура и содержание работы**

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, изложенного в первой главе, во второй главе описаны материалы и методы исследования, результаты экспериментальной работы изложены в третьей главе, заключения и списка литературы.

Работа изложена на 220 страницах машинописного текста, и оформлена в соответствии с требованиями ВАК. Рукопись содержит 22 таблицы и 75 рисунков. Список используемой литературы включает 411 источников, из них 382 на иностранных языках.

Во введении автором четко обоснованы актуальность, цели и задачи исследования, отмечены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и сформулированы положения, выносимые на защиту.

В **Главе 1** обсуждаются литературные данные о ферментах метаболизма ди- и трикарбоновых кислот. Отмечается, что в настоящее время активно изучаемой сейчас системой является клеточный метаболизм, включающий взаимопревращения большого количества молекул в виде катализируемых ферментами биохимических реакций. Приводятся многочисленные данные, что внутриклеточные процессы определяются не только последовательностью реакций, но и регуляторным влиянием интермедиатов на ферменты и генетической регуляцией уровней экспрессии ферментов, что позволяет клетке адаптироваться к изменениям внешней среды. Регуляторные механизмы в клетке ответственны за поддержание гомеостаза и переходы между различными физиологическими состояниями метаболизма. При обсуждении организации клеточного метаболизма особое внимание уделяется регуляторным аспектам фоторецепторов и проблемам передачи фитохромного сигнала и роли катионов кальция. При этом, кальмодулины могут являться связующим звеном между кальциевым и фосфатным путём передачи сигнала, а также участвуют в фосфорилировании белков. Ряд авторов допускают, что эпигенетические механизмы играют важную роль в регуляции экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма ди- и трикарбоновых кислот.

В целом литературный обзор написан на высоком научном уровне, исчерпывающе рассматривает как отечественные, так и иностранные публикации, отличается строгой логичностью построения и анализа материала, в достаточной степени вводит в круг изучаемых проблем. Прделанный диссертантом тщательный анализ литературы позволил оптимально спланировать экспериментальную часть работы.

В Главе 2 Материалы и методы исследования объектами исследования были использованы растения с С4-типом фотосинтеза - кукуруза (*Zea mays* L.), и С3-типом фотосинтеза - *Arabidopsis thaliana* L. Разработана многостадийная схема очистки ферментов цикла трикарбоновых кислот позволила осуществить выделение и получение в гомогенном или высокоочищенном состоянии ферментов, обеспечивающих метаболизм трикарбоновых кислот: сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1) цитратсинтазы (ЦС, КФ 2.3.3.1), аконитатгидратазы (АГ, КФ 4.2.1.3). Следует отметить очень большой объем как химических, так и биологических исследований, проведенных диссертантом для решения поставленных задач. Соискатель использовал широкий набор современных экспериментальных биологических, биохимических, физико-химических методов исследования. Изучение экспрессионной регуляции генов исследуемых ферментов сопровождалось разработкой специфических праймеров для идентификации генов и сиквенса ампликонов. Для анализа уровня экспрессии генов была использована количественная характеристика транскриптов матричной РНК. Для изучения механизма регуляции экспрессии генов были исследованы транскрипционные факторы различных семейств (PIF, COP, HY), кальмодулины и концентрационные колебания кальция. Впервые было проведено изучение эпигенетических механизмов новым современным методом бисульфитного секвенирования, что позволило резко увеличить эффективность определения и анализа статуса метилирования промоторных областей исследуемых генов. Были изучены эпигенетические и молекулярные способы регулирования работы генов таких ферментов как сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1), цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1), аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3). Кроме того, был установлен изоферментный состав, субклеточная локализация, физико-химические свойства и регуляция активности ферментов, обеспечивающих метаболизм цитрата, цис-аконитата и изоцитрата.

В Главе 3 представлены результаты проведенных исследований, свидетельствующих о функционировании сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы в листьях растений в условиях перехода свет-темнота с наличием в клетке изоферментов, обеспечивающих определенный метаболизм ди- и трикарбоновых кислот. Исследуемые изоферменты проявляют светозависимость, при этом активная форма фитохрома А осуществляет основную, а фитохром В вспомогательную роль в регуляции функционирования изоферментов, вызывая уменьшение уровня транскриптов и активности ферментов при облучении КС для митохондриальных форм и увеличения для цитоплазматических, что позволяет говорить об их фитохромзависимой регуляции.

Установлены формы выделенных изоферментов СДГ, определены их физико-химические и каталитические характеристики, пространственная структура. Сравнительный анализ кинетических характеристик исследуемых изоферментов СДГ, АГ и ЦС показывает их различие в сродстве к субстрату и величинам оптимальных значений концентрации водорода. Установленные различия в свойствах изоферментов также могут отражать их функциональную роль в клетках листьев кукурузы в адаптивной реакции при переходе свет-темнота. Для цитоплазматических изоферментов характерен противоположный механизм световой регуляции, свидетельствующий об активации соответствующих генов активной формой фитохромов В и А. Полученные данные свидетельствуют о тонкой регуляции фитохромной системой метаболических процессов, протекающих в митохондриях и цитоплазме, фитохромной системой в условиях фотосинтетической активности растительной клетки. Показано, что изменение величины концентрации свободных катионов кальция в клетках растений в условиях различного светового режима обусловлено состоянием фитохромной системы. Под действием красного света осуществляется фитохром-зависимое увеличение содержания кальция в ядре посредством мембранных кальциевых каналов, обеспечивая, таким образом, трансдукцию сигнала в ядро клетки. Применение специфического ингибитора кальциевых каналов (рутения красного) показало, что механизм изменения концентрации кальция в ядре связан с его перераспределением между компартментами клетки, в частности между ядром и цитоплазмой. Ряд кальмодулинов принимают участие в световой регуляции клеточного метаболизма, обеспечивая реализацию фоторецепторного сигнала на уровне функционирования ферментов ди- и трикарбоновых кислот. Основываясь на результатах исследования экспрессии генов фитохромзависимых транскрипционных факторов семейства P1F, установлено участие ряда факторов в трансдукции фитохромного сигнала в ядре растительной клетки, при этом особое значение играет фактор P1F. Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов генов исследуемых изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот указывает на отличие в характере распределения CG-динуклеотидов в данной регуляторной области гена. Для большинства генов изоферментов СДГ, ЦС и АГ показано наличие в составе их промоторов CpG-островков, что является необходимым условием их регуляции посредством изменения метильного статуса ДНК. Исследование уровня метилирования промоторов генов, кодирующих ферменты метаболизма ди- и трикарбоновых кислот, показало, что эпигенетические механизмы играют важную роль в регуляции экспрессии данных генов. Для генов СДГ, ЦС и АГ, содержащих в своем составе CpG-островки, установлена четкая зависимость между уровнем транскриптов и статусом метилирования отдельных CG-динуклеотидов. Высокий метильный уровень

промоторов генов митохондриальных форм исследуемых ферментов приводит к снижению содержания их транскриптов в растениях на свету и при облучении красным светом. При этом, для промоторов генов внемитохондриальных изоферментов аконитазы и цитратсинтазы показана обратная зависимость. Разработана модель трансдукции фитохромного сигнала в растительной клетке и механизма регуляции экспрессии генов изоферментов СДГ, ЦС и АГ в зеленых листьях кукурузы. Кроме того, фитохромзависимая активация кальмодулинов регулирует активность ДНК-метилтрансфераз, определяющих статус метилирования CpG-островков, что обеспечивает эпигенетический механизм регуляции функционирования изоферментов СДГ, ЦС и АГ. Полученные автором научные результаты не вызывают сомнений в их достоверности.

**Научная новизна работы** состоит в том, что автором впервые изучен механизм световой регуляции активности изоферментов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы и экспрессии их генов посредством фитохромной системы. Активная форма фитохрома вызывает увеличение содержания свободных катионов кальция в ядрах клеток кукурузы. Данные, полученные с применением ингибитора кальциевых каналов (рутения красного) и комплексона (ЭГТА), свидетельствуют об изменении содержания свободного кальция в ядрах клеток листьев кукурузы, что обусловлено его перераспределением между цитоплазмой и ядром. Механизм внутриядерной трансдукции фоторецепторного сигнала может осуществляться различными способами, в том числе и за счет транскрипционных факторов PIF, HY5 и COP1, что может являться рецептор-опосредованным механизмом регуляции экспрессии генов. Кроме того, транскрипционные факторы семейства PIF и HY5 играют важную роль в рецептор-опосредованном механизме трансдукции сигнала, связываясь с G-box промоторов светоиндуцируемых генов. Установлена роль транскрипционных факторов семейства PIF в механизме трансдукции светового сигнала фитохромной системой в листьях растений. Выявлено, что посредниками в передаче фитохромного сигнала могут быть транскрипционные факторы PIF1, PIF3, PIF4. Под действием активной формы фитохрома происходит регуляция активности факторов PIF1, PIF3 и PIF4, являющихся посредниками фитохромного сигнала в ядре клетки, что обусловлено изменением уровня транскриптов генов *pif1*, *pif3* и *pif4* при облучении растений красным светом. Фосфорилированная форма фитохром-зависимого транскрипционного фактора теряет связь с G-участком промоторов генов-мишеней и снижает уровень их транскриптов в клетке. Кальмодулины и кальмодулин-подобные белки выступают в качестве регуляторных факторов при клеточном ответе на стрессы различной природы, в том числе и за счет регуляции светоиндуцируемых генов. Изучен эпигенетический механизм регуляции адаптивной реакции растительного

организма к стрессовым факторам. Проведен анализ промоторов и разработаны метил-специфичные праймеры для генов исследуемых ферментов

Результаты проведенного исследования на биохимическом и молекулярном уровнях позволили выявить механизмы взаимодействия дыхательного и конструктивного обмена веществ в растительной клетке, что открывает возможности регулирования их соотношения.

### **Теоретическое и практическое значение полученных результатов**

Разработка схем эффективной очистки изоферментов дыхательного и конструктивного метаболизмов растительной клетки может быть использована в организации биотехнологического процесса по получению гомогенных препаратов ферментов из растительных организмов. Высокие величины основных показателей очищенных препаратов изоферментов (удельная активность, выход ферментативной активности, степень очистки) свидетельствуют о конкурентоспособности данной методики получения энзимов с зарубежными образцами ферментных препаратов таких известных коммерческих фирм, как "Sigma", "Serva" и др. Гомогенные препараты аконитатгидратазы могут быть применены при аналитических измерениях основных интермедиатов энергетического и конструктивного метаболизма в живых организмах, обеспечивающих состояние основного метаболизма клетки при адаптивной реакции клетки на стресс. Количественная оценка цитрата, изоцитрата, фумарата может служить показателем качества продуктов питания. Выясненные механизмы фитохром- и криптохром-зависимой регуляции ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот при различных условиях освещения позволяют оптимизировать спектральные характеристики освещения растений для повышения урожайности в практике растениеводства защищенного грунта. Важное значение имеют данные по эпигенетической регуляции активности энзимов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот. В частности, оценка метильного статуса промоторов генов исследуемых энзимов может быть использована как индикатор метаболического состояния клетки. Применение метода бисульфитного секвенирования позволяет провести таргетный анализ метилзависимых модификаций промоторных областей генов, что характеризует состояние ферментативной активности и метаболического статуса растительной клетки и может быть использовано в современных биотехнологиях, связанных с трансформацией генетического материала. Данные исследования открывают перспективы создания сельскохозяйственных растений, устойчивых к экстремальным условиям путем регулирования метаболизма.

Результаты исследований можно использовать для проведения занятий для студентов по таким дисциплинам как «Физиология растений», «Культура тканей

и клеток растений», «Вторичный метаболизм высших растений», «Методологические основы исследований в биотехнологии».

### **Вопросы и замечания к диссертационной работе**

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Однако, в порядке дискуссии хотелось бы знать мнение или пояснения соискателя по следующим вопросам:

#### **Замечания**

1. В диссертационной работе проведена очистка и исследование некоторых кинетических и регуляторных характеристик изоферментов цитратсинтазы, аконитатгидратазы и сукцинатдегидрогеназы. Показано различие изучаемых характеристик у митохондриальных и немитохондриальных изоферментов цитратсинтазы, аконитатгидратазы. Однако, их полученных данных не вполне ясно, какую локализацию в клетке листьев кукурузы имеют изоферменты СДГ1 и СДГ2.

2. Проведенные исследования показали, что изоферменты ЦС, АГ и СДГ обладают светозависимостью, что проявляется в их дифференциальной активности в зависимости от длины волны света на растения, при этом действующим фоторецептором выступает фитохромная система. В растительной клетке кроме фитохромной системы присутствует криптохромная, которая также может обеспечивать регуляцию транскрипционной активности генов. Имеет ли место в световой регуляции функционирования исследуемых изоферментов участие криптохромной системы?

3. При исследовании изменения уровня метилирования промоторов генов, кодирующих ферменты метаболизма ди- и трикарбоновых кислот, показано, что данный эпигенетический механизм играет важную роль в регуляции экспрессии генов. При наличии в составе промоторов исследуемых генов CpG-островов, установлена четкая зависимость между уровнем транскриптов и статусом метилирования отдельных CG-динуклеотидов. Однако в работе не обсуждается, что CpG-динуклеотиды не всегда располагаются в виде CpG-островков, а имеют рассеянное распределение по нуклеотидной последовательности промотора, и также могут подвергаться метилированию/деметилованию.

В работе встречаются опечатки и неудачные выражения, как, например, «грибковые заболевания».

Указанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств работы.

Диссертация и автореферат изложены хорошим научным языком, хорошо оформлены и в достаточной мере иллюстрированы таблицами и рисунками. Всего

автором опубликовано 159 научных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 21 статья в изданиях, рекомендованных ВАК, а также 32 в международных базах данных. Результаты работы апробированы на международных, всероссийских и региональных конференциях.

### Заключение

Диссертация Д.Н. Федорина «Биохимические и молекулярные механизмы фитохром-зависимой световой регуляции функционирования ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях», является оригинальной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой высокого уровня. По актуальности, объему, содержанию, научной новизне и значимости полученных результатов соответствует требованиям ВАК (п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней»), а ее автор, Федорин Дмитрий Николаевич, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

28.12.2023

Гинс Валентина Карловна

Доктор биологических наук  
(Специальность 03.00.12 – «Физиология растений»), профессор,  
Главный научный сотрудник лаборатории физиологии и  
биохимии растений, интродукции и технологии  
функциональных продуктов  
Федерального государственного бюджетного научного  
учреждения «Федеральный научный центр овощеводства»

Гинс Валентина Карловна

Почтовый адрес: 143072, Россия, Московская область,  
Одинцовский район, пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14  
тел. +7-903-747-91-63 e-mail: anirr@bk.ru

Подпись	<i>Гинс</i>	завершило
Секретарь	<i>Рыжова</i>	
28	12	2023