

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории экологии и физиологии фототрофных организмов Креславского Владимира Даниловича на диссертацию Федорина Дмитрия Николаевича «Биохимические и молекулярные механизмы фитохром-зависимой световой регуляции функционирования ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений.

Диссертационная работа Д.Н. Федорина посвящена изучению актуальной для физиологии и биохимии растений теме - механизмов световой регуляции изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растительной клетке и роли фоторецепторов-фитохромов в этой регуляции.

Известно, что активность ферментов дыхания и фотодыхания может регулироваться фитохромной системой (Igamberdiev et al. 2014, review). Однако механизмы этих эффектов, в частности связанных с активностью ферментов, слабо изучены. В этой связи Федорин сфокусировал основные усилия на изучении транскрипции генов ключевых изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот и механизме трансдукции фитохромного сигнала с участием ионов кальция, кальмодулинов, факторов транскрипции PIF. Также были изучены различные физико-химические и кинетические свойства этих ферментов и возможность эпигенитической регуляции экспрессии генов.

Диссертация Д.Н. Федорина изложена на 220 страницах машинописного текста и состоит из перечня использованных сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, заключения, списка литературы (411 источников). Работа иллюстрирована 75 рисунками, содержит 22 таблицы.

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы.

Обзор литературы представляет собой детальное описание ферментных систем, обеспечивающих метаболизм ди- и трикарбоновых кислот в

растениях. Приводится анализ исследования трансдукции фоторецепторного сигнала, осуществляемого мессенджерами, такими как ионы кальция, кальмодулины, транскрипционными факторами семейства PIF, COP1, играющими значительную роль в регуляции транскрипции генов исследуемых энзимов за счет взаимодействия со специфическими сайтами связывания в промоторной области генов-мишеней. Большое внимание уделено молекулярным механизмам регуляции экспрессии генов, в частности это относится к эпигенетическому механизму, обусловленному изменением метильного статуса ДНК. Рассмотрены особенности цитозинового метилирования ДНК, обусловленного формированием CpG-островков, в эпигенетическом контроле работы генов ферментов, в том числе энзимов окислительного метаболизма.

В целом, обзор написан хорошо, логично и дает хорошее представление о проблемах, существующих в этой области науки. На основе анализа литературы делается заключение, какие нерешенные на сегодняшний день проблемы имеются в этой области. В связи с этим, сформулирована цель работы, которая заключалась в исследовании биохимических и молекулярных механизмов фитохром-зависимой световой регуляции активности ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот и уровня экспрессии их генов

Диссертационная работа Федорина Дмитрия Николаевича выполнена с использованием в качестве объекта исследования растений кукурузы и Арабидописа с мутантами дефицитными по ФхА и ФхВ.

Работа выполнена с применением современных физико-химических методов исследования. Диссертант использовал гель-хроматографию и ионообменную хроматографию, что позволило получить гомогенные препараты сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы и исследовать их некоторые физико-химические и кинетические характеристики. Разработаны методы тщательной очистки различных изоферментов. Различия в анализируемых свойствах препаратов изоферментов указывает на возможность их регуляции как на уровне



активности ферментов, так и регуляции экспрессии их генов. Применение молекулярно-генетических методов исследования позволило решить задачи по изучению особенностей контроля транскрипционной активности генов ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот, как на уровне взаимодействия с транскрипционными факторами, так и на эпигенетическом уровне.

На основе полученных данных было сделано заключение о том, что фитохромная система осуществляет регуляцию активности ферментов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы посредством контроля уровня экспрессии их генов. Активация фитохрома блокирует транскрипцию генов митохондриальных изоферментов, что приводит к уменьшению количества их мРНК в клетке. Эти данные четко коррелируют со снижением каталитической активности сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы в листьях растений под действием красного света. Установлено, что фитохромная регуляция опосредована через внутриклеточные мессенджеры, катионы кальция. Внутриядерный механизм реализации фитохромного сигнала осуществляется специфическими транскрипционными факторами семейства PIF. Исследования мутантных форм *A. thaliana* позволили установить, что в качестве основного регулятора функционального состояния фермента выступает фитохром А, но и фитохром В тоже играет определенную роль.

Большое акцент в работе Д.Н. Федорина сделан на изучение эпигенетического механизма регуляции экспрессии генов изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот, который осуществляется посредством изменения метильного статуса их промоторов. Изменение метильного статуса CpG-островков промоторов генов исследуемых изоферментов определяет уровень их транскрипции при изменении светового режима растений. Механизм трансдукции фитохромного сигнала обуславливает регуляцию ДНК-метилтрансфераз посредством кальмодулинов.

Практическая значимость работы заключается в установлении особенности регуляции дыхательного метаболизма растений на энзиматическом уровне с участием фитохромной системы, что позволяет разработать способы контроля данных процессов, обеспечивающих увеличение урожайности и устойчивость растений при воздействии стрессовых факторов на растение, в том числе за счет оптимизации спектральных характеристик освещения.

Работа также имеет теоретическую значимость. Разработана и представлена общая гипотетическая схема трансдукции фитохромного сигнала и механизма регуляции экспрессии генов исследуемых ферментов сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы.

В заключении хочу отметить, что соискателем была проведена большая работа, результаты которой интересны, как для фундаментальных аспектов, так и для прикладных аспектов физиологии и биохимии растений/ Однако, как и любая диссертация, работа не лишена определенных недостатков. Наиболее существенными из них являются следующие:

1. Не всегда понятно какой из фитохромов играет ключевую роль в регуляции уровня транскриптов того или иного компонента фитохромного сигналинга. Например, на странице 22 Авт. И 129 диссертации написано: Активная форма фитохрома В вызывает увеличение транскриптов гена *PIF3*. Там же с другой стороны написано: Выявлено, что каскадный механизм фитохром-зависимой регуляции генов сукцинатдегидрогеназы обеспечивает транскрипционный фактор PIF3, поскольку увеличение его мРНК вызвано образованием активной формы фитохрома А в растительной клетке в ответ на ее облучение красным светом. Этот момент не совсем ясен из данных диссертанта. Скорей всего оба фитохрома важны для регуляции, хотя есть данные что для регуляции активности сукцинатдегидрогеназы красным светом наиболее важен ФхА.
2. С4 растения содержат два типа клеток, которые принимают участие в процессе фотосинтеза. Это клетки мезофилла листа и клетки обкладки сосудистых пучков. В первых клетках содержатся мелкие, содержащие граны хлоропласты. Во вторых клетках присутствуют крупные хлоропласты без гран (агранальные). Клетки обкладки листа имеют толстые клеточные стенки. Сами клетки содержат в цитоплазме большое количество хлоропластов и митохондрий. Как это учитывали при оценке



активности ферментов, выделенных из листьев кукурузы, а также при определении уровня транскриптов

3. Был ли сделан еще один контроль –КС, затем ДКС, который наилучшим образом выявляет обратимость КС последующим ДКС?
4. В работах встречается ряд нечетких формулировок. Например, в подписи к рис. 2 автореферата написано: Роль фитохромов А и В. Это еще не факт. Надо писать в подписи роль КС и ДКС, а не ФхА и ФхВ. В разделе «Влияние КС и ДКС на активность сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы в листьях кукурузы написано»: Дыхание растений на свету контролируется как на уровне метаболитов клетки, так и на уровне экспрессии генов ферментов, регуляция которых может быть опосредована несколькими механизмами, наиболее важными из которых являются фитохромы. Механизмы это не фитохромы. Надо писать: « механизмы, в которых участвуют фитохромы».
5. Судя по рисунку 3 (автореферат) в регуляции фитохром-зависимой регуляции генов сукцинатдегидрогеназы могут участвовать и другие факторы транскрипции P1F, а не только P1F3, который действительно увеличивает количество транскриптов, тогда как другие снижают. Скорей всего в этих эффектах участвует ФхВ, так как эффекты КС снимались при облучении КС вместе с ДКС.
6. Участие ионов Са в трансдукции фитохромного сигналинга рассматривается в основном на уровне цитоплазмы, где исходно находится неактивная формы Фх, которая затем перемещается в ядро клетки и связывается с факторами транскрипции и промоторами соотв. генов. Однако (стр. 20) в обсуждении больше говорится об изменении концентрации ионов кальция в ядре.
7. Стр. 9. Написано: Для этого использовали светодиоды с областью излучения 640-680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия) и 710-750 нм (ЗЛ127А-5, Россия). Желательно давать полуширину полосы и  $\lambda_{\text{макс}}$ .
8. Как были оценены достоверности разницы между данными, приведенными на рисунках. Не совсем это ясно.
9. Задача 5. Написано: «Определить зависимость уровня транскриптов генов фитохром-зависимых факторов семейства P1F от наличия активной и неактивной формы фитохрома А в клетке». По-видимому, автор имел в виду содержания активной формы фитохрома.
10. В статьях оценивается влияние КС т ДКС на активность исследуемых ферментов при действии КС и ДКС, однако соответствующие рисунки не приводятся в Диссертации и автореферате. Пожалуйста, прокомментируйте причину.

В целом диссертационная работа Д.Н. Федорина выполнена на высоком уровне. Выводы соответствуют результатам, представленным в диссертации. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Результаты

диссертационной работы опубликованы в 159 публикациях и тезисах, из них 21 - в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 32 - рецензируемых журналах систем Web of Science и Scopus. Личный вклад Дмитрия Николаевича в исследование научной проблемы в диссертации сформулирован.

Таким образом, диссертационная работа Федорина Дмитрия Николаевича «Биохимические и молекулярные механизмы фитохром-зависимой световой регуляции функционирования ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях», соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук (пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней»), а ее автор, Федорин Дмитрий Николаевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений.

« 27 » \_\_\_\_\_ декабря \_\_\_\_\_ 2023 года

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник

лаборатории экологии и физиологии фототрофных организмов

Института фундаментальных проблем биологии

Российской академии наук,

Обособленное подразделение

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

«Федеральный исследовательский центр

«Пушкинский научный центр биологических исследований

Российской академии наук» (ИФПБ РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН),

доктор биологических наук (03.01.05 Физиология и биохимия растений, 2011)



Креславский Владимир Данилович

«27» \_\_\_\_\_ декабря \_\_\_\_\_ 2023 года

Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИФПБ РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН); 142290 Россия, Московская обл., г.



