



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
**Федеральный исследовательский центр**  
**«Коми научный центр Уральского отделения**  
**Российской академии наук»**  
(ФИЦ Коми НЦ УрО РАН)

РОССИЯСА НАУКА ДА ВЪЛЫС ВЕЛӚДЧАН  
МИНИСТЕРСТВО

«Россияса наукаяс академиялӓн  
Урал юкӓнса Коми наука шӓрин»  
туялан удж нуӓдысь федеральной шӓрин  
Федеральной канму  
сьӓмкуд наука учреждение  
(ТФШ РНА УрЮ Коми НШ)



УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,  
д.б.н., член-корр. РАН  
С.В. Дѣгтева  
16 » января 2024 г.

### Отзыв

ведущей организации – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр  
Уральского отделения РАН» (ФИЦ Коми НЦ УрО РАН)  
на диссертационную работу 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 диссертационной работы

Диссертационная работа Федорина Дмитрия Николаевича посвящена изучению роли фитохромной системы в регуляции активности ряда ферментов цикла Кребса - ключевого этапа дыхания живых организмов, использующих кислород. За последние три десятилетия представления о дыхании растений во время фотосинтеза значительно поменялись – от отрицания возможности дыхания на свету до признания роли дыхания в оптимизации фотосинтеза. Вместе с тем, многие аспекты митохондриального дыхания в фотосинтезирующей клетке полностью не исследованы. Автор сфокусировал свое внимание на биохимических и молекулярных механизмах фитохром-зависимой световой регуляции активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), аконитазы и цитратсинтазы (ЦС), изменяющих свою активность и оказывающих существенное влияние на дыхание во время фотосинтеза. Исследования механизмов световой регуляции дыхания находятся в настоящее время на пике своего развития и представляют большой научный интерес, поскольку уже в ближайшей перспективе могут стать основой для создания интегральной

модели регуляции энергопластического метаболизма фотосинтезирующей клетки как уникального источника жизни на Земле. Таким образом, рассматриваемая диссертационная работа Д.Н. Федорина представляется актуальной для фундаментальной и прикладной науки.

**Структура и содержание диссертационной работы, достоверность,  
новизна и научная значимость полученных результатов**

Композиционно диссертационная работа Д.Н. Федорина включает 5 основных разделов: введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение. Завершает диссертацию заключение. Библиографический список включает 411 наименований, из них подавляющая часть на иностранном языке. Работа иллюстрирована рисунками и таблицами. Изложение текста выдержано в научном стиле.

В Главе 1 приведены общие сведения о строении белка, кодирующих генах и молекулярных аспектах функционирования ферментов – СДГ, аконитазы и ЦС. Приведены пространственные структуры и детально описаны сайты активации данных ферментных систем. Обобщены имеющиеся в литературе сведения о роли фоторецепторов в световой регуляции метаболизма растений. Дана общая характеристика фитохромов, транскрипционных факторов (ТФ), среди которых ТФ семейства PIF признаны основными фитохром-взаимодействующими, а также ТФ, участвующих в реализации сигнала по каскадному механизму. Показана роль катионов кальция и кальций-связывающего белка кальмодулина в реализации фитохромного сигнала в растительной клетке. Описан процесс метилирования ДНК, представляющий собой эпигенетический механизм регуляции функционирования ферментов. Сделано обоснованное предположение о том, что изменение метильного статуса ДНК, определяемого по количеству метилированных CG-динуклеотидов (CG-островков), имеет важное значение в фитохром-зависимой световой регуляции функционирования исследуемых ферментов

Сведения, приведенные главе 2 диссертации, дают представление об объектах исследований, которыми являются растения кукурузы (*Zea mays* L.) и *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа и нокаутных по гену апобелков фитохрома А (*phyA-201*) и фитохрома В (*phyB-1*), выращенные гидропонным способом в контролируемых лабораторных условиях. Для исследования фитохром-зависимой активации ферментов растения были облучены с помощью светодиодов красным (КС) и дальним красным (ДКС) светом. Диссертант провел трудоемкий анализ электрофоретического разделения и очистки методом ионнообменной хроматографии препаратов изоферментов СГК, аконитазы и ЦС для исследования их структуры и регуляторных свойств. Проведены определения активности

ферментов в листьях растений. Применен метод ОТ-ПЦР с разработанными праймерами для определения относительного количества транскриптов генов исследуемых ферментов. С целью определения механизмов внутриклеточной реализации фитохромного сигнала в растительной клетке проведено определение содержания свободных катионов кальция в выделенных ядрах клеток. Для исследования эпигенетических механизмов регуляции генов интереса использован метод метилспецифической ПЦР с разработанными праймерами с предварительным анализом нуклеотидной последовательности промоторов генов ферментов на наличие CpG-островков. Результаты исследований обработаны статистически.

Результаты исследований изложены и обсуждены в Главе 3, разделенной на 6 разделов и занимающей около половины объема диссертации. В разделах 3.1, 3.2 и 3.3 описаны эксперименты по очистке, определению физико-химических и кинетических характеристик изоферментов СДГ, аконитатгидратазы (АГ) и ЦС из листьев кукурузы. Показаны различия в четвертичной структуре изоферментов, их кинетических и регуляторных характеристиках, лежащих в основе механизмов регуляции уровня дыхательного метаболизма растительной клетки.

Раздел 3.4 включает исследования световой регуляции экспрессии генов исследуемых ферментов. При изучении влияния КС и ДКС на функционирование СДГ, АГ и ЦС выявлено участие фитохромной системы в регуляции функционирования ферментов на уровне содержания транскриптов генов СДГ (*SDH1-2*, *SDH2-3*), АГ (*ACO1*, *ACO2*), СЦ (*CSY1*, *CSY2*). Показано, что активная форма фитохрома (при действии КС) проявляет ингибирующее действие на митохондриальные формы ферментов. С использованием нокаутных линий *A. thaliana* (*phya-201* и *phyb-1*) уточнено, что активная форма фитохрома А подавляет экспрессию *SDH1-2* и *SDH2-3*, а фитохром В выполняет вспомогательную роль в регуляции экспрессии генов СДГ.

В разделе 3.5 освещены вопросы трансдукции светового (фитохромного) сигнала. Изучение содержания свободных катионов кальция в ядрах клеток кукурузы и применение специфического ингибитора кальциевых каналов (рутений красный) и комплексона ЭГТА показало, что фитохромная система регулирует содержание катионов кальция в ядре клеток путем его перераспределения между компартментами. Анализ паттернов экспрессии генов кальмодулина (*CALM*) и ТФ PIF3 выявил, что увеличение концентрации катионов кальция в ядерной фракции приводит к активации *CALM7*, проявляющего киназную реакцию и модулирующего работу ТФ. Посредником в передаче фитохромного сигнала в ядре является ТФ PIF3, проявляющего инактивацию при накоплении активной формы фитохрома А.

Анализ степени метилирования промоторов генов исследуемых изоферментов в различных световых условиях позволил выявить наличие CpG-островков в большинстве

генов СДГ, ЦС и АГ. Высокий метильный уровень промоторов генов митохондриальных форм ферментов приводит к снижению содержания их транскриптов в растениях на свету и при облучении КС, что, очевидно, является частью фитохром-зависимой световой регуляции их активности.

Завершает работу заключение с предложенной автором гипотетической схемой трансдукции фитохромного сигнала и механизма регуляции экспрессии генов исследуемых ферментов СДГ, ЦС и АГ.

### **Замечания и вопросы по диссертации**

1. Глава 1. Обзор литературы содержит недостаточно сведений, раскрывающих вопросы функционирования дыхания на свету во время фотосинтеза. К настоящему времени известно, что основной путь гликолиза на свету ограничен, цикл Кребса модифицирован, а конечный этап дыхания, связанный с работой ЭТЦ митохондрий, остается активным. Эти вопросы освещены в современных обзорах (Nunes-Nesi et al., 2011; Tcherkez et al., 2012, 2017; Гармаш, 2016; Igamberdiev, Vykova, 2023 и др.), обсуждены в экспериментальных статьях (ссылки можно изучить в предложенных обзорах). Особенно важно было упомянуть ссылки на работы авторов Tcherkez et al. (2005, 2012 DOI 10.1016/j.pbi.2011.12.003; 2017), установивших модификацию цикла Кребса на свету – изменение его циклической природы в гемицикл, который может работать в прямом и обратном направлении, и изучаемые диссертантом ферменты проявляют в связи с такой модификацией разную активность.

За последние десятилетия также получен обширный материал по изучению фитохромного сигналинга, опосредуемого взаимодействием ТФ COP1/ HY5/PIF3, сведения о механизмах метилирования ДНК. Наличие более современных ссылок по данным вопросам не только обогатило бы обзор литературы, но и более полно позволило бы обсудить полученные результаты.

2. Глава 2 «Материалы и методы исследования» недостаточно полно освещает методические подходы. Например, в разделе 2.1. не указаны условия выращивания растений кукурузы, ее сортовая принадлежность. В разделах 2.2.2-2.2.4, 2.2.8, 2.2.9 не расписаны процедуры выделения белка из растительной ткани, а также не везде указан состав реакционных сред для проведения ферментативной реакции. В разделе 2.2.9 указано, что «электродный буфер представлял собой смесь 0,05 М Трис-глицинового буфера, рН 8,3 с 2 мл. 1%-ного бромфенолового синего». Не совсем понятно, зачем в электродный буфер добавлять бромфеноловый синий? Обычно он добавляется к белковому экстракту для визуализации фронта фореа. Отсутствует подробное описание процедур выделения органелл, определения влияния концентрации ионов водорода на активность очищенных СДГ1 и 2, не описан эксперимент по применению ингибиторов кальциевых каналов. В разделе 2.2.22 при описании статистической обработки данных не

указаны критерии, которые использовались для анализа достоверности различий полученных данных. Обозначения достоверности различий по критериям также отсутствуют в тексте на рисунках.

3. Стр. 103. При изучении активности АГ, выделенной из листьев кукурузы, показано ингибирующее влияние сукцината, fumarата и глиоксилата на изоферменты АГ. Какую функциональную приуроченность это ингибирование по конкурентному типу может иметь *in vivo*? Может ли это быть механизмом регуляции функционирования цикла Кребса как гемицикла на свету в прямом и обратном направлении?

4. Стр. 105. Изучение кинетических характеристик разных изоформ ЦС выявило большее сродство пероксимальной формы фермента к оксалоацетату (ОА) и ацетил-КоА по сравнению с митохондриальной ЦС. Этот очень интересный момент диссертант обсуждает с использованием результатов работ, выполненных другими авторами на семенах растений (а не на листьях!). Вместе с тем, известно, что на свету цитрат для поддержания функционирования гемицикла в прямом направлении поступает скорее из цитозольного резервного пула, а не образуется из ОА с помощью цитратсинтазы из-за возможного ингибирования ПДК продуктом функционирования этого фермента – ацетил-КоА (Tcherkez et al., 2012). Поэтому, возможно, роль пероксимальной ЦС в листьях связана с поддержанием резервного пула цитрата.

5. В разделе 3.4.3. обсуждены исследования экспрессии генов аконитазы в листьях кукурузы в условиях различного светового режима. Показано подавление экспрессии гена митохондриальной формы АГ (*ACO1*) и увеличение транскрипционной активности цитозольной формы АГ (*ACO2*). Последнее, как заключает диссертант, может быть связано с изменением работы цикла Кребса на свету и ролью *ACO2* в метаболизации цитрата и, в целом, протекании биосинтетических процессов (с. 119). Это ситуация может быть вполне целесообразна в фотосинтезирующей клетке. Однако при этом автор ссылается на сведения об оттоке цитрата из митохондрий. Вместе с тем, как уже было отмечено в предыдущем замечании, есть все основания полагать, что на свету наблюдается импорт цитрата в митохондрии из цитозольного резервного пула, а его экспорт из митохондрий соответствует переходу от света к темноте во время так называемого послесветового выброса  $\text{CO}_2$  при дыхании (light-enhanced dark respiration) (Tcherkez et al., 2012).

6. С. 144. Рис. 53. В варианте КС заметно снижение относительного количества транскриптов *CALM7-2*. В тексте же сделан вывод о том, что данный кальмодулин не принимает участия в трансдукции светового сигнала. Возможно, требуются более детальные исследования (не только экспрессии генов), чтобы иметь возможность делать данное заключение.

7. Превалирующая часть раздела 3.6, посвященная обсуждению эпигенетических механизмов регуляции генов исследуемых изоферментов, содержит описание подходов к разработке праймеров и таблицы с праймерами (12, 13, 14, 15, 16), которые следовало бы разместить в методической части диссертации или приложении. Обилие таблиц и методического материала затрудняет восприятие и анализ работы.

8. В диссертации встречаются несогласованные предложения (с. 14, 21, 49, 53, 66, 84, 91, 93, 100, 106, 143, 147 и т.д.), не используемые в науке термины (с. 111, 115 – скорость функционирования гена, с. 117 – скорость работы гена). В таблице 2 нет ссылок на источники литературы, содержащие приведенные сведения.

#### **Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о порядке присуждения ученой степени доктора биологических наук**

Вопросы и сделанные замечания не снижают научной ценности, теоретической и практической значимости диссертационного исследования. Диссертация Федорина Дмитрия Николаевича выполнена на современном научном уровне, характеризуется логичностью изложения и обоснования положений, вынесенных на защиту, вносит существенный вклад в развитие представлений о механизмах световой регуляции дыхания в фотосинтезирующей клетке. Текст автореферата отражает основные результаты диссертационной работы, степень научной новизны и практическая значимость результатов исследований, отражены выносимые на защиту положения диссертационной работы, а также указаны определенные практические рекомендации по использованию данных диссертационной работы. Содержание автореферата соответствует тексту диссертации и указанным публикациям.

Результаты исследований были доложены на всероссийских и международных конференциях, а также отчетных конференциях преподавателей и сотрудников Воронежского госуниверситета. По теме диссертации опубликовано 53 статьи в рецензируемых изданиях, в том числе 21 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук, 32 – в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Диссертационная работа «Биохимические и молекулярные механизмы фитохром-зависимой световой регуляции функционирования ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденному Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Федорин Дмитрий Николаевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

Диссертация и отзыв обсуждены на заседании лаборатории экологической физиологии растений Института биологии – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» (ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН), протокол № 1 от 15 января 2024 года.

Отзыв подготовлен:

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник  
лаборатории экологической физиологии растений  
ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН

 Гармаш Е.В.

Организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения  
Российской академии наук» (ФИЦ Коми НЦ УрО РАН)

Сайт: <http://www.komisc.ru>

E-mail: [info@frc.komisc.ru](mailto:info@frc.komisc.ru)

Тел.: (8212) 24-10-26, факс: (8212) 24-22-64

Почтовый адрес: Коммунистическая ул., д. 24, Сыктывкар, ГСП-2, Республика Коми,  
167982



Подпись Гармаш Е.В. Заведующий  
Начальник общего отдела  
ФИЦ Коми НЦ УрО РАН

Евгений Леонов М.Н.  
16» января 2024 г.