«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН)

д.б.н. _____ Д.В. Гельтман

02 декабря 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Флорес Каро Орландо де Хесус «Молекулярно-биохимические способы регуляции метаболизма сукцината в листьях *Zea mays L.* и *Triticum aestivum L.* при адаптивной реакции на солевой стресс», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.21 – «Физиология и биохимия растений»

Актуальность темы и ее обоснование. Выявление механизмов, позволяющих растениям успешно вегетировать на засоленных почвах, является важной задачей физиологии растений, имеющей ряд очевидных практических приложений. Хлоридное засоление негативно влияет на растения, препятствуя прорастанию и развитию семян, фотосинтезу, а в дальнейшем цветению и плодоношению, что приводит к значительному падению урожайности сельскохозяйственных культур. Одной из первичных реакций на солевой стресс является усиление клеточного дыхания и продукции АТФ в митохондриях, энергетических станциях растительных клеток. Возможность ускорения синтеза АТФ обеспечивается накоплением и интенсификацией окисления интермедиата цикла трикарбоновых кислот сукцината. В связи с вышеизложенным диссертационная работа Флорес Каро Орландо де Хесус, посвященная изучению функционирования и регуляции фермента сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и сукцинат-оксидазной системы в листьях растений при солевом стрессе, является высоко актуальным исследованием.

Целью рецензируемой диссертационной работы стало изучение изменения биохимических и молекулярных аспектов функционирования фермента сукцинатдегидрогеназы и сукцинат-оксидазной системы в листьях растений С3 и С4 типа при кратковременном солевом стрессе. Автором были получены гомогенные препараты изоферментов СДГ в высокоочищенном состоянии из листьев растений, что позволило выявить изменения их кинетических свойств под действием засоления. Изучены изменения ферментативной активности СДГ и сукцинат-оксидазной системы в условиях солевого стресса. Впервые был проведен сравнительный анализ метильного статуса промоторов и относительных уровней экспрессии генов, кодирующих субъединицы СДГ кукурузы, в условиях засоления. Показана эпигенетическая регуляция экспрессии трех субъединиц СДГ у кукурузы. Установлено наличие цис-регуляторных элементов, соответствующих семействам транскрипционных факторов bZIP, C2H2, WRKY, MYB, NAC, AP2/ARF и ERF, потенциально участвующих в регуляции генов СДГ у кукурузы и пшеницы. Обнаружено, что как у кукурузы, так и у пшеницы изменения экспрессии генов, кодирующих

гидрофильные субъединицы СДГ, коррелируют с наличием в промоторной области генов сайтов связывания факторов транскрипции WRKY и NAC.

Структура и содержание диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах основного текста и состоит из введения, обзора литературы (Глава I), экспериментальной части (Глава II), результатов и их обсуждения (Глава III), заключения, выводов, списка цитируемой литературы, который включает 202 источника, а также Приложения на 10 страницах, которое содержит три таблицы и пять рисунков. Иллюстративный материал основного текста включает 28 рисунков и 6 таблиц.

Введение, в котором сформулированы цель и задачи работы, убедительно показывает актуальность проведенного исследования, которая связана с изучением СДГ как одного из ключевых ферментов, участвующих в углеродном обмене и клеточном дыхании. Автором упомянуты метаболические пути, в которых принимает участие сукцинат, а также отмечена малоизученность регуляции СДГ у растений в отличие от клеток человека, животных, бактерий и дрожжей.

Глава 1. Обзор литературы (стр. 14-54). Обзор литературы изложен на 41 странице и состоит из четырех разделов. В первом разделе рассматриваются современные представления о сукцинатдегидрогеназе (митохондриальном комплексе II) растений, описывается субстратная и «сигнальная» роль сукцината, механизм реакции окисления сукцината в фумарат с участием четырех субъединиц СДГ. Диссертантом собрана информация о структуре сукцинатдегидрогеназы прокариотических и эукаритотических клеток, факторах сборки СДГ комплекса, приводятся также сведения о дополнительных специфических для растений, описанных в 2003 году четырех субъединицах, функции которых остаются неизвестными. Автором изложены биохимические аспекты регуляции СДГ, а именно прямые и косвенные регуляторные механизмы белкового комплекса СДГ. Описаны механизмы прямого ингибирования активного центра фермента оксалоацетатом и малонатом (интермедиатами ЦТК), косвенная регуляция со стороны сукцинил-коэнзим А-синтетазы, неконкурентное ингибирование СДГ соединениями, которые связываются с сайтами, отличными от каталитического центра СДГ (например, железо-серными кластерами или центром связывания убихинона Qp), СДГ-активирующее действие одно- и двухвалентных анионов, регуляция СДГ соотношением АДФ/АТФ, а также посттрансляционными модификациями.

Второй раздел содержит информацию о молекулярно-эпигенетических аспектах функционирования СДГ. Автором охарактеризованы ядерные гены, кодирующие субъединицы СДГ, их количество и степень консервативности у растений. Описано значение метилирования промоторных областей кодирующих генов растений, как одной из наиболее распространенных форм эпигенетической регуляции ферментов, приводящая чаще всего к ингибированию транскрипции и «замалчиванию генов». Приведены сведения о полученных ранее в лаборатории диссертанта результатах исследований статуса метилирования СДГ и уровня экспрессии генов СДГ на разных стадиях роста и развития растений, под действием разного спектрального состава света и в условиях гипоксии.

Третий раздел посвящен влиянию солевого стресса на метаболизм растений. Описаны современные представления о механизмах повреждающего действия трех составляющих солевого стресса - ионном, осмотическом и окислительном стрессе, а также молекулярно-физиологические ответные реакции растений на каждый из типов стресса. Рассмотрены осмопротекторные молекулы и осмотические сигнальные пути, механизмы поддержания ионного гомеостаза при засолении, в частности, кальций-зависимые системы SOS1-3 белков, системы антиоксидантной защиты от активных форм кислорода (низкомолекулярные антиоксиданты и антиоксидантыне ферменты). Рассмотрено влияние засоления на функциональность цикла трикарбоновых кислот в целом и изменение активности отдельных ферментов ЦТК в ответ на засоление у разных видов растений, таких как цитратсинтазы, аконитазы, изоцитратдегидрогеназы, 2-оксоглутаратдегидрогеназы,

фумаратгидратазы, малатдегидрогеназы, а также шунтового метаболического пути (ГАМК-шунта). Автором собраны сведения о путях транспорта электронов в ЭТЦ митохондрий растений и о стимулирующем влиянии солевого стресса на митохондриальное дыхание, экспрессию генов и содержание белка альтернативной оксидазы у растений. Четвертый раздел «Обзора литературы» раскрывается роль нескольких семейств транскрипционных факторов (ТФ) в регуляции экспрессии генов при засолении. Автором рассмотрена структура и эволюционная консервативность WRKY, NAC, ERF/AP2, bZIP семейств ТФ, и приведены примеры их участия в регуляции активности генов-мишеней, ассоциированных с ответными реакциями растений на засоление.

Обзор литературы не лишен ряда недостатков, среди которых нужно отметить стилистическую тяжеловесность текста, обилие сложносочиненных и сложноподчиненных предложений, несогласованность по смыслу частей и членов предложений. В «Обзоре литературы» отсутствует отдельный подраздел, посвященный сукцинат-оксидазной системе митохондрий. Подразделы по генетической регуляции экспрессии генов, кодирующих СДГ, и эпигенетической регуляции функций СДГ включают много содержательных повторов. В обзоре очень поверхностно описаны CpG островки, в то время как они являются важной частью промоторов генов СДГ, а изучение статуса метилирования CG-динуклеотидов в листьях кукурузы составляет одну из задач диссертационной работы. Обзор литературы уместно было бы завершить кратким заключением для обобщения изложенных сведений и расстановки акцентов на неизученных вопросах функционирования СДГ, которые автор планирует решить в исследовании.

Глава 2. Экспериментальная часть (стр. 55-65) состоит из двух подразделов. В первом подразделе сформулирована цель исследования и шесть задач, необходимых для ее достижения. В втором подразделе, «Объекты и методы исследования», приведены данные о модельных объектах диссертационной работы: проростки *Zea mays L.* (сорт Воронежская 76) и *Triticum aestivum L.* (сорт Галина). Описан способ экспериментального моделирования солевого стресса, выделение митохондрий из листового материала, впечатляющий набор методик выделения, очистки, анализа ферментов и молекулярно-генетической регуляции их активности: определение активности сукцинатдегидрогеназы и сукцинатоксидазной системы, определение количества белка, выделение и очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы, определение гомогенности ферментных препаратов и ферментативной активности изоформ, выделение и модификация ДНК, выделение тотальной РНК, метил-специфичной ПЦР и ПЦР в реальном времени, биоинформатический анализ промоторных областей генов СДГ на наличие островков CpG и сайтов связывания ТФ, а также определение активности цитохромоксидазного и альтернативного оксидазного путей дыхания (АОП). Недостатком данного раздела является отсутствие описания используемых автором модификаций процедуры выделения митохондрий, как одного из ключевых этапов для корректной оценки уровня митохондриального дыхания (раздел 2.2.4.). Также очень мало внимания уделено описанию двух важнейших этапов определения уровня экспрессии генов интереса - а именно подбору референсных генов и постановке обратной транскрипции (автором указан только используемый в реакции обратной транскрипции набор OT-MMLV от фирмы «Евроген» с вырожденными праймерами). Остается неясным, оценивалась ли эффективность количественной ПЦР с референсным геном фактора элонгации Ef-1α, а также, проводилось ли определение качества синтезированной кДНК каким-либо методом (например, с помощью классической ПЦР с праймерами к гену убиквитина)? В целом в работе был применен весьма широкий спектр современных методов и подходов, и автором продемонстрирован высокий уровень подготовки как в решении задач молекулярной биологии и биоинформатики, так и физиологии растений в целом.

Глава 3. Результаты и обсуждение (стр. 66-100). Изложение полученных автором результатов начинается с подраздела, описывающего эксперименты по изучению влияния солевого стресса на функционирование сукцинатдегидрогеназы в in organello системе. На препаратах митохондрий, выделенных из листьев кукурузы и пшеницы, было изучено воздействие хлорида натрия на ферментативную активность СДГ. Показано, что после кратковременной 5 минутной обработки хлоридом натрия препаратах выделенных митохондрий активность СДГ возрастала, что по мнению автора является следствием прямой активации каталитический центр фермент хлорид-анионами. Затем проводилась очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы и изучение их кинетических характеристик. Высокоочищенные изоферменты СДГ выделили из листьев растений, выращенных в условиях долговременного солевого стресса. Показано, что в листьях независимо от добавления хлорида натрия синтезируется по две изоформы СДГ с разной электрофоретической подвижностью, что, как предполагается автором, вызвано различиями в поверхностном заряде изоферментов, связанных с их структурной организацией. Примечательно, что засоление не вызывало сдвигов pH-оптимума изоферментов пшеницы (ни СДГ1, ни СДГ2), а для кукурузы показано снижение pH-оптимума изоферментов СДГ2 кукурузы. Изоферменты СДГ из листьев кукурузы и пшеницы имели сходные кинетические свойства как при солевом стрессе, так и в контрольных условиях. Далее уже в условиях кратковременного солевого стресса при 150 мМ NaCl по потреблению кислорода было изучено влияние засоления на митохондриальное дыхание и активность сукцинат-оксидазы. Выявлено, во-первых, более мощное увеличение активности сукцинат-оксидазной системы в листьях пшеницы по сравнению с листьями кукурузы. Во-вторых, митохондрии пшеницы характеризовались более высокой скоростью потребления кислорода. Автор заключает, что адаптивная реакция у растений с метаболизмом С3-типа требует более высокой активности сукцинат-оксидазной системы для нормального функционирования митохондриальной дыхательной цепи в условиях солевого стресса. Кроме того, в условиях засоления показано увеличение АОП, причем более выраженное в листьях кукурузы, чем у пшеницы. Автор предполагает, что АОП выполняет защитную функцию, препятствуя образованию активных форм кислорода и азота при засолении. Далее приведены результаты изучения изменения активности СДГ в условиях засоления в листьях *in vivo*. Показано усиление каталитической активности фермента СДГ у изучаемых видов растений под действием засоления с достижением максимальной активности энзима через 24 ч инкубации листьев в растворе с добавлением хлорида натрия. Обнаружено, что ответная реакция на солевой стресс в листьях пшеницы отличается ранним по сравнению с листьями кукурузы изменением каталитической активности СДГ. В следующем подразделе изложены результаты экспериментов по влиянию солевого стресса на регуляцию экспрессии генов гидрофильных субъединиц СДГ1 и СДГ2. Убедительно показано, что в листьях кукурузы и в листьях пшеницы увеличение концентрации мРНК гена субъединицы СДГ1 коррелировало с повышением общей активности СДГ. Активация экспрессии СДГ1 у пшеницы происходило быстрее, чем у кукурузы. Экспрессия СДГ2 достоверно увеличивалась в листьях кукурузы и пшеницы, но в листьях пшеницы увеличение носило временный характер. В ответ на засоление показано также повышение уровня экспрессии гена пшеницы TaSDHAF1, кодирующего фактор сборки, необходимый для корректной интеграции субъединицы 2 в ферментный комплекс II, и продемонстрирована его корреляция с активностью TaSDH2. Автором описаны сложные паттерны изменения экспрессии генов мембраносвязанных субъединиц СДГ3 и СДГ4 в течение 24 ч инкубации листьев с добавлением хлорида натрия. В ответ на обработку NaCl уровень транскриптов СДГ3 повышался, в то время как уровень экспрессии СДГ4 снижался в листьях обоих видов растений. Проведённый биоинформатический анализ промоторной области генов, кодирующих субъединицы СДГ, в *Z. mays* и *T. aestivum*, позволил идентифицировать различные сайты связывания транскрипционых факторов, участвующих в регуляции изучаемых генов. Автором были

выявлены *cis*-регуляторные элементы, соответствующие нескольким семействам ТФ – bZIP, C2H2, WRKY, MYB, NAC, AP2/ARF и ERF. Большинство изученных автором генов, кодирующих субъединицы СДГ, содержали наличие сайтов связывания WRKY и NAC. Исследование нуклеотидных последовательностей промоторов генов, кодирующих СДГ1 и СДГ2, позволило установить наличие или отсутствие в них потенциальных островков CpG. Показано, что островки CpG отсутствовали в СДГ1 кукурузы, но имелись в промоторных областях остальных изученных генов. Автором обнаружен и описан сложный паттерн метилирования промоторных областей генов СДГ, а именно метильного состояния CG-динуклеотидов, в листьях кукурузы при засолении. Для нескольких изученных генов (СДГ1-3) показана разная степень корреляции уровня экспрессии со статусом метилирования промоторов. Достоверно показано, что при засолении в течение первых 6 часов инкубации в NaCl снижение метильного статуса СДГ4 сопровождается выраженным снижением его транскрипционной активности.

Заключение (стр. 100-104). В Заключении диссертант кратко и ёмко обобщает полученные данные и приводит краткий анализ обнаруженных различий в свойствах и регуляции сукцинатдегидрогеназы, а также сукцинат-оксидазной системы при солевом стрессе в листьях растений с разным типом фотосинтеза. Автором разработана оригинальная разработана гипотетическая схема регуляции функционирования СДГ в митохондриях листьев кукурузы при солевом стрессе. После этого следуют **Выводы** (стр. 105-106), полностью подтвержденные экспериментальными данными.

Автором проведен большой объем экспериментальных работ с использованием сложных методик, собраны качественные данные и проведен анализ полученных результатов. Однако, существенным недостатком диссертационной работы является крайне небрежное её оформление. В постановке Цели автором допущены сразу две орфографические ошибки (раздел 2.1, стр. 55), библиографические ссылки в тексте диссертации оформлены с нарушением ГОСТ – первая ссылка во Введении имеет порядковый номер 169. Имеются ошибки в описании свойств альтернативной оксидазы, которая как следует из текста диссертации, чувствительна к цианиду (стр. 50). На гипотетической суммирующей схеме не расшифрованы обозначения процессов, пронумерованных цифрами [1] и [2] (стр. 104). В целом полученные автором данные обсуждены без привлечения огромного багажа знаний по изменению активности других ферментов ЦТК под действием засоления, полученных в результате многолетних предшествующих данной работе блестящих исследований кафедры биохимии и физиологии клетки Воронежского Государственного Университета.

При общем положительном впечатлении от диссертационной работы, ее объема, и точности выводов, хотелось бы обсудить некоторые вопросы:

1. Каково функциональное значение метильного статуса CpG островков в промоторных областях кодирующих генов?
2. Могут ли быть связаны выявленные автором различия в характеристиках СДГ и регуляции ее активности в листьях кукурузы и пшеницы - со скоростью доставки хлорида натрия к клеткам мезофилла, обусловленные разными анатомическими и физиологическими особенностями С-3 и С-4 растений?
3. Объясните противоречие в разном характере изменения экспрессии генов гидрофильных и мембраносвязанных гидрофобных субъединиц СДГ при засолении? Можно ли предположить взаимосвязь этих изменений с функционированием протеолитических путей деградации этого фермента при засолении?
4. Из текста диссертации осталось неясным, каким образом было оценено количество специфических факторов транскрипции из семейств bZIP, C2H2, WRKY, MYB, NAC, AP2 и ERF, которые могут регулировать экспрессию генов, кодирующих компоненты фермента СДГ в условиях абиотического стресса. Верно ли, что из множества всех ТФ,

регулирующих гены на фоне солевого стресса, отобранных по базе данных, было выбрано подмножество ТФ, которое имеют сродство к выявленным в промоторных областях генов СДГ специфическим cis-регуляторным элементам?

Приведенные вопросы не подвергают сомнению новизну и оригинальность представленной диссертационной работы. Она является целостным и завершенным научным исследованием, которое целесообразно продолжить и развить научным коллективом кафедры биохимии и физиологии клетки ВГБОУ ВО «Воронежский государственный университет».

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы. Результаты исследования были доложены Флорес Каро Орландо де Хесус на шести международных и российских конференциях. Основные результаты настоящей работы изложены в 14 публикациях – тезисах и статьях, среди которых 5 статей опубликованы в журналах, включенных в список ВАК, и индексированы в Web of Science и Scopus.

Суммируя все вышесказанное, следует заключить, что диссертационная работа Флорес Каро Орландо де Хесус «Молекулярно-биохимические способы регуляции метаболизма сукцината в листьях *Zea mays L.* и *Triticum aestivum L.* при адаптивной реакции на солевой стресс» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобразования и науки РФ к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а ее автор, Флорес Каро Орландо де Хесус, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 - физиология и биохимия растений.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории молекулярной и экологической физиологии (протокол № 62 от 28 ноября 2024 г.).

Отзыв подготовлен:

Зав. лабораторией молекулярной и экологической физиологии БИН РАН,
к.б.н. Войцеховская О.В._____

В.н.с. лаборатории молекулярной и экологической физиологии БИН РАН,
к.б.н. Тютерева Е.В._____

Санкт-Петербург, 2 декабря 2024 г.

Подпись руки О.В. Войцеховской Е.В. Тютеревой
ЗАВЕРЯЮ начальник ОК Н.А. Быкова
02.12.2024
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук