

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Шпаковского Г.В.

на диссертационную работу Белькова Вадима Игоревича

**«Изучение ретроградной регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы
GDH1 и *GDH2 Arabidopsis thaliana*»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Важную роль в функционировании растительной клетки играют наделённые собственным геномом органеллы – хлоропласты и митохондрии. Только в последние десятилетия стало понятно, что все три генома (ядерный, митохондриальный и хлоропластный) активно взаимодействуют между собой: от ядра к органеллам идут сигналы, контролирующие экспрессию генов хлоропластов и митохондрий и во многом определяющие развитие и функционирование этих органелл (антероградная регуляция), а от органелл в ядро поступают сигналы, воздействующие на экспрессию ядерных генов (ретроградная регуляция). Это вполне логично, поскольку многие белковые компоненты органелл растений закодированы в ядерном геноме, что и делает актуальной как координацию сбалансированного синтеза разнообразных белков митохондрий и хлоропластов, так и регуляцию единого ответа растительной клетки на поступающие внешние сигналы. К настоящему времени выявлено уже множество ядерных генов, экспрессия которых изменяется при смене условий «темнота-свет» или зависит от изменения уровня сахаров в растительной клетке. Такими генами являются, в частности, гены *GDH1* и *GDH2* НАД(Н)-зависимой глутаматдегидрогеназы (GDH) – фермента, участвующего в метаболизме углерода и азота, а также в регуляции скорости процессов дыхания, особенно в условиях углеводного голодания. Хотя в 2008 году канадскими авторами (Miyashita Y., Good A.) была высказана гипотеза о том, что изменения в экспрессии генов глутаматдегидрогеназы от минимального на свету до максимального в темноте зависит от доступности углерода в виде углеводов, по-настоящему комплексного изучения регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* в растениях не проводилось.

В связи с этим диссертационная работа В.И. Белькова, посвящённая изучению ретроградной регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы *GDH1* и *GDH2* растений арабидопсиса, безусловно, является актуальной и востребованной. Учитывая, что глутаматдегидрогеназа в растениях является важным связующим звеном между метаболизмом азота и углерода и играет роль одного из главных ферментов в

метаболизме аминокислот и углеводов, работа В.И. Белькова по изучению экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* может иметь в перспективе и практическое значение.

Диссертационная работа оформлена традиционным образом и включает следующие основные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список используемой литературы. Объем диссертации – 125 страниц, в ней имеются 31 рисунок и 2 таблицы, список литературы включает 147 источников. Во введении (6 стр.) автор обосновывает актуальность проблематики и научную значимость работы, формулирует цель и задачи исследования. Перед разделом «Введение» (на стр. 5 и 6) приведён список сокращений и основных обозначений, приведённый, к сожалению, не в алфавитном порядке, что привело к досадному повторению обозначения МЕсРР.

Обзор литературы (40 стр.), посвящённый анализу прежде всего таких тесно связанных с темой диссертации проблем, как светозависимая, сахарозависимая и гормональная регуляция экспрессии генов растений, свидетельствует о хорошей осведомленности автора в современном состоянии знаний по этим проблемам и о его широкой общебиологической эрудированности. Обзор грамотно составлен, видно стремление автора излагать все детали, анализировать даже самые новые, возможно, даже не совсем устоявшиеся на данный момент механизмы ретроградной регуляции экспрессии ядерных генов растений (существование и возможная физиологическая роль хлоропластной формы НАДФ(Н)-зависимой GDH, передача пластидно-ядерного сигнала через белок GUN1, пути переноса в ядро информации о восстановленном или окисленном состоянии пула пластохинона и т.д.). В целом обзор представляет собой довольно ценную и современную сводку, написанную, как и вся диссертация, хорошим, добротным по стилю русским языком. Как отмечалось выше, содержание обзора литературы напрямую связано с темой собственных исследований диссертанта, так что данный раздел диссертации даёт читателю ясное обоснование места исследований, проведённых автором, в общей системе знаний об основных путях светозависимой и сахарозависимой (углеводозависимой) регуляции экспрессии ядерных генов растений.

Вместе с тем, к этой части работы есть несколько замечаний. Обзор литературы не имеет обобщающего названия, и это, к сожалению, привело к его некоторой хаотичности. Он состоит из трёх разделов, и уже по их названиям видно, что они весьма разнородны и по значимости, и по системности материала (1.1. Суточные колебания экспрессии генов глутаматдегидрогеназы и их возможные причины; 1.2. Светозависимая регуляция ядерных генов растений; 1.3. Изменение углеводного статуса как фактор, регулирующий экспрессию ядерных генов растений). Первый из этих разделов явно выпадает из общего ряда, тем более, что многие мысли и положения

из этого раздела повторяются в таких разделах диссертации, как «Введение» и «Результаты и обсуждение».

Выбранную автором систему цитирования (вначале указывается только первый автор, а затем, после названия статьи, более полный, хотя опять же почему-то весьма сокращённый, список авторов), которая пусть и соответствует ГОСТу, нельзя признать удачной, и не только потому, что она практически не используется в серьёзной научной литературе, но и потому, что её применение привело к целому ряду неточностей: авторы Ford, Lea, 2007 на стр. 13 превратились в Forde, Lea на стр. 113 (ссылка № 38); приведённые на стр. 14 ссылки на Terece-Laforgue et al., 2004 и Masclaux-Daubresse, 2006 в Списке используемой литературы вообще не обнаруживаются; ссылка в подписи к Рис. 1 на Restivo et al., 2004 (стр. 15) в Списке используемой литературы оказывается на самом деле Restivo, 2004 (стр. 120, ссылка № 104) и т.д. Следует признать ошибочным и перевод с английского сокращения GABA (γ -аминобутириновая кислота) на стр. 13 – очевидно, что имеется в виду γ -аминомасляная кислота. Обзор иллюстрирован всего лишь тремя рисунками, два из которых (Рис. 2 и 3) даны почему-то на английском языке. Конечно, названия многих генов и ферментов и по-русски будут обозначаться сходным образом, но термины “starch” или “energy deprivation” вряд ли уместны в русскоязычной диссертации. Текст обзора стоило проиллюстрировать бóльшим числом рисунков, таблиц или попросту наглядных схем регуляции активности генов.

Раздел «Материалы и методы исследований» (9 стр.) свидетельствует о высоком методическом уровне работы. В нём даётся полное представление о большом наборе генно-инженерных, биохимических и физиологических методов, использованных в работе. Все экспериментальные методики написаны чётко и достаточно подробно, так что могут быть легко воспроизведены. Похвально, что приведены источники (фирмы-производители) практически всех важнейших использованных в работе материалов, в частности, таких ингибиторов дыхательной цепи и ферментов, как DBMIB, DCMU и норфлюразон (стр. 54).

Сильное впечатление производит основной (как по объёму, так и по содержанию), раздел диссертации: «Результаты и обсуждение» (42 стр.). Он посвящён описанию и анализу экспериментальных результатов, полученных в данной работе, и подкупает как ясностью изложения материала, так и логичностью своего построения.

Экспериментальная работа проводилась В.И. Бельковым по следующим основным направлениям:

1. Исследование роли гексокиназы 1 и транскрипционного фактора ABI4, ключевых компонентов сахарозависимых регуляторных путей, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.
2. Изучение возможного участия хлоропластно-ядерных сигналов, связанных с синтезом тетрапирролов, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.
3. Анализ влияния хлоропластно-ядерных сигналов, связанных с изменением редокс-состояния пула пластохинона, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.
4. Изучение роли активных форм кислорода в регуляции экспрессии исследуемых генов.

К решению всех поставленных задач диссертант подошел очень комплексно и основательно, тщательно исследовав экспрессию генов *GDH1* и *GDH2* в правильно подобранных генетических линиях арабидопсиса: при разных физиологических условиях и на разных стадиях развития растений, с использованием необходимых биохимических инструментов (прежде всего, разнообразных ингибиторов тех или иных стадий фотосинтетического транспорта электронов).

Из наиболее интересных результатов можно отметить следующие.

1. Автором впервые показано, что сахарозависимая репрессия гена *GDH2* регулируется не гексокиназой 1, а осуществляется с участием транскрипционного фактора ABI4, который при этом не оказывает существенного влияния на светозависимую регуляцию экспрессии генов глутаматдегидрогеназы.
2. Впервые показано, что повышение уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* в темноте происходит медленнее, чем снижение на свету. При этом светозависимая регуляция экспрессии этих генов возможна только при функционально активных хлоропластах, происходит без участия фитохромов и криптохромов и не связана с сигналами, возникающими при синтезе тетрапирролов.
3. Окисленное состояние пула пластохинона в темноте или в присутствии ингибитора фотосинтеза DCMU на свету приводит к повышению экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, что указывает на хлоропластно-ядерную регуляцию экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, связанную с редокс-состоянием пула пластохинона тилакоидных мембран.
4. Активные формы кислорода, образующиеся при обработке перекисью водорода, либо вследствие экспозиции растений в условиях избыточной освещенности, вызывают повышение экспрессии гена *GDH2* и, по-видимому, являются отдельным типом сигналов, регулирующих экспрессию исследуемых генов независимо от сигналов, возникающих при изменении редокс-состояния пула пластохинона.

Таким образом, в работе впервые получены убедительные экспериментальные данные об участии хлоропластных сигналов в контроле светозависимой экспрессии

ядерных генов *GDH1* и *GDH2* растений. Получено новое подтверждение того, что светозависимая регуляция генов глутаматдегидрогеназы зависит от доступности углеводов, уровень которых существенно возрастает при смене условий «темнота → свет».

Стоит отметить многоплановость подхода диссертанта к решению поставленных задач, в частности умелое использование в экспериментальной работе разнообразных мутантов *Arabidopsis thaliana* и ингибиторов отдельных стадий дыхательной цепи и фотосинтеза. По объёму проведённой экспериментальной работы и по значимости полученных результатов диссертационная работа В.И. Белькова превышает средний уровень кандидатских диссертаций и с очевидностью свидетельствует, что мы имеем дело с талантливым, вполне сформировавшимся, квалифицированным исследователем и научным работником. Раздел «Результаты и обсуждение» прекрасно иллюстрирован (27 рисунков), так что полученные экспериментальные данные, всесторонне проанализированные В.И. Бельковым в этом разделе, сомнений не вызывают. Замечено, пожалуй, лишь одно несоответствие в экспериментальных данных, приведённых в диссертации (рис. 20) и в автореферате (рис. 7), которое, пожалуй, требует объяснения со стороны диссертанта. Непонятно, почему уровень экспрессии гена *GDH1* в линии *gun1* в присутствии норфлуразона в одном случае при добавлении сахарозы понижается (на рис. 20 в диссертации), а в другом (на рис. 7 в автореферате) – повышается?.. Кроме того, явно неудачной по стилю выглядит фраза на стр. 94 диссертации: «Дополнительно оценивали экспрессию гена – нашего (?) исследмаркера (?) хлоропластной дисфункции DNAJ». Сделанные замечания несколько не снижают общий высокий научный уровень работы В.И. Белькова.

Выводы (1 стр.) работы, представленные сразу за кратким Заключением (4 стр.), сформулированы четко и адекватны полученным результатам.

К в целом грамотно оформленному списку цитируемой литературы, включающему 147 ссылок, помимо замечаний, высказанных выше (по поводу Обзора литературы), особых нареканий нет. Впрочем, есть некоторый разнобой в использовании то излишне полного названия научных журналов (например, *Annals of the New York Academy of Sciences* в ссылке № 25), то неоправданного, точнее откровенно жаргонного и неправильного сокращения PNAS (ссылки № 72, 81 и 138). Стоит похвалить автора за обширное использование литературы самых последних лет – в списке цитируемой литературы 27 ссылок на статьи 2013-2015 годов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Выводы соответствуют полученным в работе результатам и поставленным задачам. Все данные диссертации опубликованы, в том числе в ведущих отечественных

специализированных журналах, рекомендованных ВАК (Журнал стресс-физиологии и биохимии, Биохимия), а также представлены на всероссийских и международных конференциях. Диссертационная работа Белькова В.И. «Изучение ретроградной регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы *GDH1* и *GDH2 Arabidopsis thaliana*», является законченным научно-квалификационным исследованием и полностью соответствует требованиям Положения о порядке присуждения научным и научно-педагогическим работникам научных степеней ВАК Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Бельков Вадим Игоревич несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Результаты работы могут быть использованы в курсах лекций по физиологии и биохимии растений на соответствующих кафедрах ведущих университетов России, а также в исследовательской работе в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» (г. Новосибирск), ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

12 февраля 2016 г.

/ Г.В. Шпаковский /

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО) России
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)
Адрес: 117997 Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая 16/10

Шпаковский Георгий Вячеславович,
Заведующий лаборатории механизмов генной экспрессии ИБХ РАН,
доктор биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология,
старший научный сотрудник, тел: +7(495)3306583, факс: +7(495)3357103,
E-mail: gvs@ibch.ru

Подпись Г.В. Шпаковского удостоверяю

Учёный секретарь ИБХ РАН

д. ф-м. н.



/ В.А. Олейников /