

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного

бюджетного учреждения науки

Институт физиологии

растений им. К.А. Тимирязева РАН

чл.-корр. РАН

Кузнецов Вл.В.

«03» мая 2017 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Кондаковой Марины Александровны «Влияние гипотермии на состав и активность системы суперкомплексов окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха *Pisum sativum L.*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Актуальность проблемы

К настоящему времени убедительно доказано, что многие белки или ферменты, катализирующие биохимические реакции в живых организмах, выполняют свои функции, взаимодействуя с другими белками как важными детерминантами их функционирования и регуляции. Как относительно недавно выяснилось, такое поведение в частности свойственно многим белкам, функционирующем в дыхательной или электрон-транспортной цепи митохондрий животных и растительных клеток, играющих ключевую роль не только в запасании и трансформации в них энергии, но и в регуляции клеточного метаболизма. Согласно результатам теоретических исследований, проведенных в последние годы, рассматриваемая реорганизация комплексов дыхательной цепи в суперкомплексы способна выступать в качестве важного фактора, существенно ускоряющего в ней перенос электронов в ходе редокс-реакций, катализируемых такими комплексами. Кроме того, при этих условиях в существенной степени возрастает стабильность всей системы окислительного фосфорилирования митохондрий из-за резкого снижения вероятности образования опасных редокс-интермедиаторов, приводящих к генерации активных форм кислорода (АФК). К настоящему времени накапливаются

также экспериментальные данные о том, что супрамолекулярная ассоциация индивидуальных комплексов дыхательной цепи сильно зависит от характера их липидного окружения во внутренней мемbrane митохондрий и может модулироваться в ответ на перекисное окисление ее липидных компонентов, изменение мембранного потенциала и фосфорилирование мембранных белков. Принимая во внимание доказанную на сегодняшний день сигнальную роль митохондрий в животных и растительных клетках, очевидно, что такой динамический характер суперкомплексов позволяет включаться им в регуляцию или адаптацию клеточного метаболизма организмов в стрессовых условиях их окружения посредством контролирования стресс-индуцируемых клеточных ответов. Это во многом указывает на актуальность исследований, направленных на выяснение динамики супрамолекулярной организации комплексов дыхательной цепи митохондрий растительных клеток в условиях стресса. Однако из анализа имеющихся литературных данных следует, что в настоящее время исследования такого рода представляют собой достаточно сложную экспериментальную проблему. На решение данной проблемы как раз и направлена диссертационная работа Кондаковой М.А., которая посвящена выяснению вопроса о том, как условия гипотермии влияют на состав и активность суперкомплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха.

Научная новизна

В работе впервые проведен сравнительный анализ организации и активности дыхательных комплексов внутренней мемbrane митохондрий этиолированных проростков гороха, как в контроле, так и в условиях гипотермии разной интенсивности. Это позволило выявить наличие в мемbrane митохондрий как ранее обнаруженных у других растений суперкомплексов – респирасом, так и более сложных, ранее неизвестных, ассоциаций – мегакомплексов, содержащих альтернативные оксидазы и дегидрогеназы. Полученные в работе данные, касающиеся структурной динамики этих мультибелковых комплексов в условиях холодовой адаптации и низкотемпературного стресса, указывают на ее вероятную роль в регуляции процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях растений.

Основные полученные результаты, их теоретическая значимость.

Диссертация Кондаковой М.А. написана по традиционной схеме и содержит все необходимые разделы работы. В литературном обзоре ее изложены основные аспекты

биоэнергетики митохондрий растений, в том числе структурные и функциональные особенности устройства и работы их дыхательной цепи, современные представления о супрамолекулярной организации дыхательных комплексов в митохондриях различных организмов, а также имеющиеся данные о действии гипотермии на клетки растений и функционирующие в них митохондрии. Представленная здесь информация описана достаточно детально и основательно. В завершение обзора автор формулирует ряд гипотез, касающихся возможной функциональной значимости ассоциированных дыхательных комплексов, но, к сожалению, не подводит читателя к постановке конкретной задачи исследований, проведенных в данной работе. Вместе с тем, очевидно, что основная цель автора состояла в экспериментальной проверке справедливости высказанных гипотез на примере исследуемых митохондрий проростков гороха в условиях низкотемпературного стресса.

Методы исследования, описанные в следующем разделе диссертационной работы, отличаются разнообразием и адекватны поставленным задачам. Они включают в себя достаточно детально изложенные физиологические и биохимические подходы, а также протеомный анализ, причем высокое качество представленного иллюстративного экспериментального материала обращает на себя внимание.

Основные результаты рассматриваемой работы, связанные с идентификацией суперкомплексов дыхательной цепи в митохондриях проростков гороха, выращенных в нормальных условиях и после их акклиматизации к низкотемпературному стрессу, заслуживают особого внимания. Солюбилизация белковых комплексов внутренней митохондриальной мембрany с помощью относительно мягкого неионного детергента дигитонина и последующее фракционирование их с использованием двумерного голубого нативного электрофореза показали, что комплексы дыхательной цепи в этой мемbrane органелл ассоциируют друг с другом в суперкомплексы. В их состав входят главным образом комплексы I, III и IV в определенных комбинациях, тогда как комплекс II не является компонентом таких суперкомплексов, но входит в состав некоторых мегакомплексов. Кроме того, показано также наличие дополнительных суперкомплексов, содержащих в своем составе, помимо указанных выше дыхательных комплексов, альтернативные оксидоредуктазы и АТФ-синтазу. В свете этих результатов обращает на себя внимание и заслуживает уважения тот факт, что, судя по приложениям А и Б, автор проанализировал большой массив имеющихся в литературе данных, касающихся идентификации суперкомплексов в дыхательной цепи митохондрий значительного числа животных и растительных клеток.

В заключение Кондакова М.А. на основе полученных данных предлагает возможную схему реорганизации мембранный системы окислительного фосфорилирования митохондрий при гипотермии разной интенсивности.

Замечания и вопросы по диссертационной работе.

В целом результаты, представленные в рассматриваемой работе, представляют значительный интерес и создают надежный фундамент для дальнейших исследований. Вместе с тем их интерпретация вызывает ряд вопросов, которые состоят в следующем:

- 1) Свойственны ли методикам выделения и фракционирования суперкомплексов дыхательной цепи из митохондрий проростков гороха какие-либо недостатки и, если да, то какие из них наиболее существенны? Например, не является ли артефактом присутствие в суперкомплексах комплекса II? В этой связи следует отметить, что в настоящее время в литературе имеется ряд данных, доказывающих необходимость нахождения этого комплекса в дыхательной цепи митохондрий в свободной, неассоциированной форме.
- 2) Тот же вопрос можно адресовать и выявлению в составе суперкомплексов альтернативной оксидазы, тем более что сам автор отмечает, что этот фермент в основном находится в свободной, несвязанной форме.
- 3) Хотя считается, что формирование в дыхательной цепи суперкомплексов снижает вероятность образования в ней АФК, можно ли считать, что, в свою очередь, это способно приводить к подавлению сигнальной функции митохондрий, как раз и основанной на генерации тех или иных форм активного кислорода.
- 4) Могут ли суперкомплексы, присутствующие во внутренней мемbrane митохондрий, служить возможным фактором, определяющим наблюдаемую в определенных условиях, динамику морфологии этих органелл?
- 5) Обращает на себя внимание категоричность утверждений автора об определенной модуляции скорости образования АФК в митохондриях проростков гороха в условиях закаливания и стресса. Дело в том, что в этой работе прямо не измерялась скорость этого процесса и о генерации АФК судили косвенно, по степени перекисного окисления липидов в целой растительной ткани. Кроме того, из факта увеличения активности комплексов I и III нельзя делать вывод о росте продукции АФК, поскольку их генерация запускается только после достижения донором электронов определенного редокс-потенциала, позволяющего их перенос на молекулу кислорода. Например, известно, что генерация АФК, обусловленная

блокированием переноса электронов по дыхательной цепи под действием цианида или антимицина А, никак не связана с увеличением активности ее дыхательных комплексов, ответственных за этот процесс.

- 6) Представляется очевидным, что только одной электронной микроскопии явно недостаточно для оценки чистоты выделенной фракции митохондрий как весьма существенного, как указывает сам автор, фактора, определяющего надежность и достоверность информации, получаемой при разделении белковых комплексов дыхательной цепи митохондрий. Хотя в работе отмечается, что для оценки чистоты выделенной фракции митохондрий использован также биохимический метод, на самом деле он применялся здесь лишь для оценки интактности органелл, то есть целостности их наружной мембранны. К сожалению, в работе отсутствует анализ чистоты органелл по активности маркерных ферментов различных клеточных компартментов, в том числе по степени обогащения полученного материала митохондриями следя за активностью цитохрома с оксидазы, хотя визуально чистота выделенной фракции митохондрий не вызывает сомнений.

Рекомендации по использованию результатов работы.

Результаты диссертации могут быть рекомендованы как лекционный материал, а также использованы в исследованиях, проводимых на кафедрах биофизики и физиологии растений биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва), на кафедре физиологии растений СПбГУ (Санкт-Петербург), на кафедре биофизики ННГУ (Нижний Новгород), в Институте физиологии растений РАН им. К.А. Тимирязева (Москва), в Институте биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, в Институте фундаментальных проблем биологии РАН (Пущино) и других научных учреждениях.

Заключение.

Однако высказанные выше замечания и возникающие вопросы никак не умаляют значимости результатов проведенной диссертационной работы. Несомненно, она знаменует собой шаг вперед в плане выяснения организации и функционирования дыхательных комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий растений в условиях гипотермии и тем самым вносит существенный вклад в решение этой проблемы. Выводы диссертации хорошо обоснованы, автореферат отражает ее содержание, результаты работы представлены статьями в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Все сказанное выше дает веские основания для вывода о том, что рассматриваемая диссертационная работа «Влияние гипотермии на состав и активность системы суперкомплексов окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха *Pisum sativum L.*» полностью удовлетворяет всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Кондакова Марина Александровна, несомненно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Ведущий научный сотрудник
лаб. мембран растительных клеток
Института физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН, д.б.н



Andreiev I.M.

Зав. лабораторией
мембран растительных клеток
Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН, д.б.н.



Trofimova M.C.

Отзыв обсужден на семинаре лаб. мембран растительных клеток 2 мая 2017 г.

ПОДПИСЬ
ЗАВЕРИЛ
ЗАВ. ОТД. КАДРОВ



03 мая 2017г.

Andreeva I. M., Trofimova M. C.