



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
ФГАОУ ВО "Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского"
доктор физ-мат. наук, профессор


В.Б. Казанцев

« 8 » ноября 2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского"

на диссертационную работу **Журиковой Елены Михайловны «Исследование участия альфа-карбоангидразы 2 и альфа-карбоангидразы 4 в фотосинтетическом метаболизме *Arabidopsis thaliana*»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Актуальность темы.

Процесс фотосинтеза, в ходе которого энергия квантов солнечного света преобразуется в энергию химических связей, является предметом исследования отдельных ученых, научных групп, лабораторий и целых исследовательских институтов. Рассматриваются различные аспекты этого чрезвычайно сложного процесса, выясняются молекулярные механизмы отдельных стадий, пути регуляции активности, влияние разнообразных факторов на фотосинтез. Рассматриваемая работа посвящена изучению роли альфа-карбоангидразы в процессе фотосинтеза. Потенциальная значимость этого фермента для растений может быть оценена на основании множественности генов, кодирующих карбоангидразы. Также необходимо подчеркнуть высокое относительное содержание карбоангидразы в сравнении с другими белками. Несмотря на идентификацию генов, кодирующих карбоангидразы, и определение содержания в клеточных компартментах, четкие сведения о роли фермента в процессе фотосинтеза на сегодняшний день отсутствуют.

Наличие большого числа вариантов кодирования карбоангидраз в геноме в сочетании с различиями в содержании у различных видов растений дают основания полагать, что активность фермента может играть роль в развитии адаптации растительного организма к изменяющимся факторам среды.

Таким образом, рецензируемая работа, которая посвящена изучению роли участия альфа-карбоангидраз в фотосинтетическом метаболизме у растений *Arabidopsis thaliana* является актуальной, а ее результаты имеют как фундаментальное значение, так и могут найти практическое применение.

Новизна исследования, полученных результатов и выводов.

Выполненное исследование обладает существенной новизной. В частности, хотелось бы отметить, что соискателем впервые показано, что карбоангидразы α KA2 и α KA4 имеют важное значение для фотосинтетического метаболизма высшего растения *Arabidopsis thaliana*. Установлено, что исследованные карбоангидразы имеют противоположное влияние на нефотохимическое тушение, что позволяет оптимизировать функционирование фотосинтетического аппарата растений в конкретных условиях окружающей среды.

Впервые установлено местонахождение двух карбоангидраз в хлоропласте высшего растения *A. thaliana*, в частности показано расположение α KA2 на стромальной стороне тилакоидной мембраны.

Анализ содержания диссертации.

Диссертационная работа структурно построена по традиционному плану и состоит из списка сокращений и обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 216 ссылок. Работа изложена на 132 страницах, содержит 32 рисунка и 17 таблиц.

Во **введении** автором убедительно и аргументировано обоснована актуальность проблемы, которой посвящена диссертационная работа.

В главе 1 «**Обзор литературы**» представлен тщательный анализ имеющихся на сегодняшний день данных литературы по двум взаимосвязанным направлениям: 1) характеристика семейств карбоангидраз, их строение, механизмы функционирования, механизмы регуляции активности ферментов; 2) организация фотосинтетической электрон-транспортной цепи и методов регистрации активности фотосинтеза. Проведенный теоретический анализ обозначает основные пробелы в имеющихся на сегодняшний день знаниях, что позволило логично сформулировать задачи исследования.

Глава 2 «**Материалы и методы**» написан достаточно подробно, что позволяет воспроизвести все использованные автором методы без привлечения специальной литера-

туры. В работе применен целый спектр современных методов исследования. Особо необходимо отметить детализированное описание определения активности световой стадии фотосинтеза, что позволяет уверенно раскрывать механизмы процессов, протекающих на тилакоидных мембранах, а также в фотосинтетическом аппарате в целом.

Глава 3 «**Результаты**» в диссертации разбита на восемь отдельных подразделов. В первых из них (3.1 – 3.3) исследована зависимость экспрессии генов, кодирующих α КА4 или α КА2, от внешних факторов и изучены различия в морфометрических показателях и содержании крахмала в листьях у мутантов по α КА4 или α КА2 в сравнении с растениями дикого типа. Показано, что вес мутантов по α КА2 ниже, а мутантов по α КА4 выше в сравнении с диким типом. Такую же тенденцию имеют различия в содержании крахмала. Это позволило предположить различия в активности фотосинтеза у указанных мутантов, которая была исследована в следующих подразделах (3.4 – 3.5). В ходе анализа автором был выявлен кажущийся противоречивым феномен, заключающийся в том, что скорость ассимиляции CO_2 у мутантов по α КА2, которые имеют меньшую массу и меньшее содержание крахмала, выше в сравнении с диким типом, а у мутантов по α КА4, которые, в свою очередь, имеют большую массу и содержание крахмала – ниже. При этом квантовый выход фотосистемы II, как один из параметров, характеризующий активность световой стадии был ниже у мутантов по α КА2 и выше у мутантов по α КА4. Объяснение кажущегося противоречия было дано при изложении последующих разделов главы «Результаты», в частности подразделе 3.6, а также в главе «Обсуждение».

На следующих этапах были выявлены различия в содержании пероксида водорода в листьях мутантных растений в сравнении с диким типом (подраздел 3.7), а также изучена локализация исследуемых карбоангидраз (подраздел 3.8). Полученные данные свидетельствуют о расположении карбоангидразы α КА2 в тилакоидной мембране вблизи фотосистемы 2. Карбоангидраза α КА4, предположительно, располагается на стромальной стороне тилакоидной мембраны.

В целом, говоря об экспериментальной части, следует отметить, что рецензируемая работа характеризуется хорошим методическим уровнем проводившихся исследований и большим объемом полученных автором данных.

Интерпретация полученных экспериментальных результатов проведена в главе 4 «Обсуждение». Несомненным достоинством этого раздела работы является наличие обобщающей таблицы (таблица № 17 в диссертации и таблица № 5 в автореферате), в которой подчеркнуты основные выявленные в работе различия между растениями дикого

типа и мутантов. Наличие такой сводки позволяет оценить работу в целом и облегчает формирование схемы процессов, обуславливающих различия в параметрах процессов у растений дикого типа и исследуемых мутантов. В качестве итогового результата можно рассматривать предложенную автором схему расположения и функционирования α КА2 и α КА4 в тилакоидной мембране, которая позволяет судить о роли этих ферментов в функционировании фотосинтетического аппарата растений в различных условиях окружающей среды.

Содержание автореферата и опубликованных работ полностью отражают основные положения диссертации. Выводы диссертационной работы соответствуют поставленным цели и задачам, корректны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений. Материалы диссертационной работы хорошо апробированы на ряде конференций, в том числе, международных.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выполненные диссертантом исследования имеют важное как фундаментальное, так и, в перспективе, прикладное значения. Важным результатом с точки зрения фундаментальной науки являются установление роли карбоангидраз α КА2 и α КА4 в процессе фотосинтеза, а также выяснение особенностей функционирования фотосинтетического аппарата в различных условиях. Последний аспект имеет в перспективе прикладное значение, поскольку полученные знания могут быть применены при разработке методов направленного повышения устойчивости сельскохозяйственных растений. Важное практическое значение имеет и обнаруженная в работе особенность мутантов по α КА4 накапливать большее количество крахмала.

Также результаты рассматриваемой работы могут быть использованы в учебном процессе в высших учебных заведениях при разработке и модернизации курсов по физиологии растений, а также спецкурсов, посвященных фотосинтезу и адаптации растений.

Вопросы и замечания.

Оценивая, в целом, положительно рассматриваемую работу необходимо остановиться на следующих вопросах и замечаниях:

1. Основным вопросом к представленному исследованию является объяснение некоторых свойств мутантных растений (Табл. 17) в свете предлагаемой диссертантом гипотезы. Так если α KA4 является специфическим механизмом, обеспечивающим поступление протонов к PsbS белку, то не до конца понятно, как нарушение функционирования (мутантные линии) приводит к снижению квантового выхода ФС I и уменьшению ассимиляции CO_2 . Скорее, можно ожидать, что при нарушении одного из механизмов нефотохимического тушения, оно должно стать несколько ниже (что и наблюдается в экспериментах), вследствие этого поток электронов в электронно-транспортной цепи должен возрасти. Ожидаемо, это должно приводить к возрастанию квантового выхода ФС I (быстрее восстанавливается P700+) и усилению ассимиляции. Как объясняется такое несоответствие? Может ли оно быть связано, например, с изменениями активности циклического потока?

Аналогично в случае мутантов, нокаутированных по α KA2. Если в соответствии с предварительной гипотезой она нарушает дополнительный поток протонов через мембраны тилакоидов, то такие мутанты должны иметь более низкий градиент pH. Тогда, в частности, не очень понятно, почему у таких мутантов наблюдается более высокая энергезависимая компонента нефотохимического тушения?

2. В работе обнаружено значительное возрастание концентрации пероксида водорода у мутантов по α KA4 в сравнении с ДТ. Приведено объяснение причин такого увеличения, однако, не затронут вопрос о том, насколько значимо такое повышение пероксида в качестве внутри (меж-)клеточного сигнала или в качестве непосредственно повреждающего, в том числе мембраны, агента.
3. В работе показаны значительные различия в величине эффективного квантового выхода ФС II у растений дикого типа при единой концентрации CO_2 (рис. 3 автореферата и рис. 19, 23 диссертации). При этом подчеркиваются отличия мутантов от дикого типа. Происходит увеличение Y_{II} в сравнении с диким типом у мутантов по α KA4 и снижение в сравнении с диким типом у мутанта по α KA2. Однако, сопоставление величин Y_{II} между мутантами дает противоположную картину. Что правомернее сравнивать и чем могут быть обусловлены различия в величине Y_{II} у растений дикого типа в отдельных сериях измерений?

Частные вопросы и замечания:

- на рисунке 25 приводятся коэффициенты нефотохимического тушения при различных концентрациях углекислого газа. Зависимость для коэффициента у контроля от концентрации представляется достаточно интересной: максимум при низкой концентрации, минимум при оптимальной (800 ppm CO₂), и снова возрастание при высокой концентрации углекислого газа. Как можно объяснить последний эффект?
- из рисунка 28 видно, что у квантовых выходов ФС1 для контроля и мутанта, нокаутированного по α КА4, различаются временные динамики. Известны ли механизмы таких различий?
- в таблице 1 автореферата приведены средние значения, а в тексте говорится, что типичный пример.

Высказанные выше замечания не носят принципиального характера и не снижают несомненной высокой научной значимости работы.

Заключение.

Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы, ее теоретическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Журиковой Елены Михайловны «Исследование участия альфа-карбоангидразы 2 и альфа-карбоангидразы 4 в фотосинтетическом метаболизме *Arabidopsis thaliana*», соответствует требованиям "Положения о порядке присуждения ученых степеней" ВАК, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 –биохимия.

Заведующий кафедрой биофизики, д.б.н.



В.А. Воденеев

Доцент кафедры биофизики, к.б.н.



В.С. Сухов

Отзыв обсужден и единогласно утвержден на заседании кафедры биофизики Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского 7 ноября 2016 г., протокол № 4.

Зав. каф. биофизики ННГУ



Воденеев В.А.

Воденеев Владимир Анатольевич
доктор биологических наук
заведующий кафедрой биофизики
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского

603950, г. Нижний Новгород,
пр. Гагарина, 23

v.vodeneev@mail.ru
+7(831)462-32-15