

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Фатыховой Валерии Сергеевны «Структурно-функциональные свойства эпоксиалкогольсинтазы СУР5164В1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 — «физиология и биохимия растений».

Актуальность исследования. Оксипирины, продукты перекисного окисления липидов, представляют собой одну из наиболее многокомпонентных, широко распространённых и функционально значимых групп биологически активных соединений. Хотя изучение этих соединений привлекает внимание многих исследователей, многие вопросы данного направления до настоящего времени не решены и остаются среди наиболее острых проблем современной липидологии и физиологии в целом. До конца не исследованы пути метаболизма оксипиринов, механизмы их образования и дальнейших превращений, мало сведений о ферментах, катализирующих биосинтез и катаболизм оксипиринов у различных организмов, свойствах этих ферментов и кодирующих их генах. Несмотря на давнюю историю изучения, остается много вопросов о функциях оксипиринов в клетке и значимости для организма в целом. В свете этого большой интерес представляет изучение ферментов клана СУР74 цитохромов Р450, которые отвечают за синтез оксипиринов у широкого круга организмов. До сих пор наиболее изученными остаются ферменты СУР74 высших растений, обладающих тремя видами активности — гидропероксидлиазной (ГПЛ), дивинилэфирсинтазной (ДЭС) и алленоксидсинтазной (АОС). Однако разнообразие генов семейства СУР74 в геномах различных организмов предполагает и другие типы катализа. Это предположение основано на разработанной ранее модели механизма катализа, согласно которой общим промежуточным соединением в реакции является эпоксиаллильный радикал. Исходя из этого, среди продуктов липоксигеназного каскада с высокой вероятностью могут быть обнаружены другие оксипирины. Таким образом, выявление и характеристика ферментов СУР74 у организмов различных таксонов представляет собой крайне интересную задачу. В связи с вышесказанным, актуальность темы диссертационной работы В.С. Фатыховой, посвященной изучению структурно-функциональных свойств эпоксиалкогольсинтазы СУР5164В1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*, не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования. Обнаружение автором функционального фермента клана СУР74 у одного из видов бурых водорослей — морских многоклеточных организмов, которые представляют самостоятельную ветвь эволюции эукариот, вносит

новое понимание в вопрос эволюции ферментов CYP74 как наиболее древних цитохромов P450. Показано, что данный фермент является эпоксиалкогольсинтазой, которой присвоено тривиальное название EsEAS. Расшифрован механизм каталитического действия нового фермента. Методами биоинформатики и сайт-направленного мутагенеза выявлен консервативный домен ферментов CYP74, потенциально важный для реализации каталитической активности. Выявлено широкое распространение эпокиспиртов у бурых водорослей, что указывает на возможную универсальность эпоксиалкогольсинтазной ветви липоксигеназного каскада у этих организмов.

Общая оценка работы. Работа изложена на 169 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Иллюстративный материал представлен 7 таблицами и 44 рисунками. Список литературы включает 246 источников, из них — 243 на иностранных языках. Во «Введении» диссертант аргументировано обосновывает постановку проблемы и её актуальность, четко определяет цели и задачи работы, отмечает научную новизну и научно-практическую значимость проведенного исследования.

Обзор литературы всесторонне и обстоятельно отражает современное состояние и перспективы выбранной темы исследований. На основе глубокого анализа имеющейся в литературе информации В.С. Фатыхова в ясной и информативной форме рассматривает такие вопросы, как метаболизм оксипинов, физиологическое значение данных соединений, структура и функции ферментов семейства CYP74, их субстратная специфичность, распространение и внутриклеточная локализация. Несомненный интерес представляет анализ филогенетических деревьев ферментов, входящих в клан CYP74, а также сходных с ними по аминокислотным последовательностям ферментов, с использованием средств биоинформатики. Отдельная глава посвящена описанию объекта исследования — бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*.

Глава «Материалы и методы исследования» включает описание широко спектра современных методов биоинформатики, молекулярной биологии, биохимии и биофизики.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из 9 разделов и содержит подробное и логически связанное описание результатов и их трактовку. В геноме бурой водоросли *E. siliculosus* в ходе биоинформационного анализа впервые выявлена последовательность, кодирующая полипептид, обладающий высокой степенью сходства с последовательностями цитохромов семейства CYP74. Соответствующий ген был искусственно синтезирован и клонирован в векторе для экспрессии в бактериях. В ходе дальнейшей работы был получен и охарактеризован соответствующий рекомбинантный

белок. Методами ЯМР и газовой хромато-масс-спектрометрии было показано, что фермент EsEAS катализирует превращение 9-гидроперекиси линолевой кислоты в 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую кислоту, в основном, (9*S*,10*S*,11*S*)-эпимер с *транс*-эпоксидным кольцом. Это позволило идентифицировать новый фермент как эпоксиалкогольсинтазу (ЭАС), которой было присвоено тривиальное название EsEAS. Благодаря эксперименту с применением меченого изотопом ¹⁸O субстрата был расшифрован механизм каталитического действия фермента EsEAS, включающий следующие стадии: (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт.

Таким образом, в диссертационной работе приведен ряд убедительных доказательств, свидетельствующих о том, что обнаруженная в геноме *Ectocarpus siliculosus* последовательность кодирует фермент, обладающий эпоксиалкогольсинтазной активностью, который вполне обоснованно может быть отнесен к клану ферментов CYP74.

В результате сравнения аминокислотной последовательности EsEAS с ферментами, обладающими сходной субстратной специфичностью, а именно алленоксидсинтазой томата LeAOS3 и дивинилэфирсинтазой табака NtDES дикого типа и их мутантными формами, был выявлен консервативный белковый домен, потенциально важный для реализации каталитической активности. Замены в последовательностях EsEAS C365F и C365V и LeAOS3 F391V и F391C не привели к изменениям типа каталитической активности. Результатом мутаций было снижение каталитической активности по сравнению с ферментом дикого типа, что указывает на возможное значение данного сайта в каталитическом действии или корректном сворачивании ферментов. В случае с дивинилэфирсинтазой табака был получен ряд интересных мутаций, одна из которых (V379C) приводила к образованию небольшого количества продуктов, характерных для других ферментов CYP74 — альфа-кетона (АОК), 9-оксононановой кислоты (ГПЛ), дивинилового эфира (ДЭС), а также эпокиспирта (ЭАС). Таким образом, благодаря экспериментам с использованием сайт-направленного мутагенеза была доказана общность механизма катализа эпоксиалкогольсинтазы *Ectocarpus siliculosus* и классических представителей семейства CYP74. Полученные данные подтверждают предположение о сходстве механизмов каталитического действия у разных ферментов CYP74 и свидетельствуют о том, что эпоксиаллильный радикал представляет собой не только промежуточный продукт реакций, катализируемых CYP74 (Grechkin, 1998), но и

своеобразную точку переключения в различных направлениях реакций, соответствующих ветвям липоксигеназного каскада — алленоксидсинтазной, дивинилэфирсинтазной, эпоксиалкогольсинтазной и, вероятно, гидропероксидлиазной.

Важная часть экспериментальной работы была посвящена выявлению значения N- и C-концевых последовательностей для каталитического действия фермента EsEAS. Удаление N-концевой последовательности размером 107 аминокислотных остатков незначительно снизило каталитическую активность фермента, при этом специфичность образования продуктов осталась практически неизменной. Таким образом, несмотря на укорочение последовательности EsEAS на треть, механизм каталитического действия практически не меняется. Следовательно, для каталитического действия важной является C-концевая последовательность EsEAS.

Дальнейшим этапом работы послужило выявление и идентификация оксилипинов в талломах представителей бурых водорослей: *Saccharina cichorioides*, *Sargassum pallidum*, *Coccophora langsdorfii* и *Pilaella littoralis*. У всех видов выявлена 12,13-эпокси-11-гидрокси-9-октадеценовая кислота, у трех видов (кроме *S. pallidum*) — 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; эти соединения являются продуктами превращения 9- и 13-гидроперекисей, соответственно. Кроме того, в спектрах всех бурых водорослей были обнаружены несколько изомеров гидроксикислот, у которых гидроксильная группа расположена в положениях C9, C12, C13. Таким образом, у всех изученных бурых водорослей в спектре оксилипинов обнаружен ряд эпокиспиртов и тригидрокси-кислот, что указывает на широкое распространение эпоксиалкогольсинтазной активности у бурых водорослей.

Следует отметить, что согласно современной классификации, бурые водоросли относятся к одному из 6 кластеров эукариотических организмов — *Chromalveolata*. Бурые водоросли, наземные растения и животные разделились на раннем этапе эволюции эукариот. Секвенирование генома первого представителя бурых водорослей — *E. siliculosus* позволило сделать большой шаг в молекулярно-генетических и эволюционных исследованиях. Обнаружение у представителей *Chromalveolata* липоксигеназного каскада с участием ферментов CYP74, ранее считавшихся эволюционным приобретением высших растений, позволяет расширить представление о молекулярной эволюции цитохромов.

На общую положительную характеристику работы влияет качественное техническое оформление рукописи и автореферата. Материал изложен хорошим литературным языком, представлено много информативных схем, облегчающих восприятие и понимание работы.

Возражений принципиального характера по результатам исследования и их интерпретации не имеется. В результате проведенной работы были выполнены все 6 задач; все результаты отражены в 9 выводах.

При всех указанных достоинствах представленной диссертации хотелось бы отметить следующие вопросы и замечания:

1. Методы сбора талломов микроводорослей и работы с ними не отражены в методическом разделе диссертации, хотя частично представлены в разделе 3.5. Чем обусловлен выбор организмов, послуживших объектами исследования в дополнение к *E. siliculosus*?
2. Был ли аннотирован к моменту начала работы ген, кодирующий фермент EsEAS, в геноме *E. siliculosus*? Есть ли гомологи (ортологи) этого фермента у других групп одноклеточных водорослей?
3. У представленных филогенетических деревьев не указаны значения bootstrap-поддержки. Тестировали ли достоверность топологии этих деревьев?
4. При описании положения фермента в различных системах молекулярной систематики и филогении автор использует определения "семейство" и "клан" как взаимозаменяемые. Различаются ли эти понятия?
5. Известен ли липидный состав *E. siliculosus* или его ближайших родственников? Какие классы липидов являются основными, каков их жирнокислотный профиль? Чем обоснован выбор гидроперекисей линолевой и линоленовой кислот в качестве субстрата для характеристики обнаруженного фермента?

В целом, следует отметить, что высказанные замечания никоим образом не влияют на общую высокую ценность представленной к защите диссертации и на ее результаты и выводы.

В заключение можно сделать вывод, что диссертационная работа В.С. Фатыховой представляет собой законченное и оригинальное исследование в актуальной области современной физиологии и биохимии растений, выполненное на самом современном уровне и содержащее новые факты, а также важные обобщения. Результаты, полученные диссертантом, представляют большой теоретический и практический интерес и могут быть использованы в дальнейшей разработке проблем липидологии в части исследования окислительного метаболизма полиненасыщенных жирных кислот. Автор работы — В.С. Фатыхова — проявила способности к самостоятельным научным исследованиям, умение разработать актуальную научную проблему, имеющую важное теоретическое и практическое значение. Все основные результаты диссертации опубликованы в научной печати. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Таким образом, рассмотренная диссертационная работа Валерии Сергеевны Фатыховой «Структурно-функциональные свойства эпоксиалкогольсинтазы СУР5164В1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*» полностью отвечает требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений, а её автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор
кафедры биоинженерии Биологического факультета
Федерального государственного бюджетного
учреждения высшего образования
«Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»

А.Е. Соловченко

7 марта 2017 г.

Контактные данные официального оппонента

Почтовый адрес: 119234, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1, с. 12.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
биологический факультет.

Телефон/факс: +7(495) 939-25-87; +7(495) 939-43-09

Адрес электронной почты: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Подпись д.б.н., проф. кафедры биоинженерии
биологического факультета МГУ
Соловченко А.Е. заверяю

Декан биологического
факультета МГУ, академик РАН
Кирпичников Михаил Петрович

