

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института  
биохимии и физиологии растений и  
микроорганизмов Российской академии наук



И.Х.Н. профессор

С.Ю. Щеголев

«09» марта 2017 г.

**Отзыв ведущей организации**

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН о теоретической и практической ценности диссертации ФАТЫХОВОЙ Валерии Сергеевны «Структурно-функциональные свойства эпоксиалкогольсинтазы СУР5164В1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Актуальность исследования. Оксипилены являются физиологически активными соединениями, образуемыми в результате окислительной трансформации полиненасыщенных жирных кислот. Эти биологически активные соединения могут функционировать либо в качестве сигнальных молекул, либо защитных веществ, часто проявляя сочетание тех и других свойств. Поскольку стрессовая устойчивость является важнейшей характеристикой жизнестойкости растений, изучение биосинтеза растительных оксипиленов и их биологической активности, несомненно, является актуальным.

Оксипилены синтезируются при участии липоксигеназ и цитохромов P450 семейства СУР74. Семейство СУР74 включает только ферменты растений, разделяемых на три типа: дегидразы – алленоксидсинтазы (АОС) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС), а также изомеразы – гидропероксидлиазы (ГПЛ). К настоящему времени охарактеризовано несколько десятков ГПЛ и АОС, а также несколько ДЭС разных видов растений. Однако недавно в классификации ферментов СУР74 произошли значительные изменения. Ряд нерастительных цитохромов P450 различных семейств, наряду с растительными ферментами

семейства CYP74, были объединены в клан CYP74 на основании данных филогенетического анализа.

В свете этого большой интерес представляет изучение ферментов клана CYP74 цитохромов P450, которые отвечают за синтез оксипинов у широкого круга организмов. Кроме того, разнообразие генов семейства CYP74 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 эпокиспирты и их производные - тригидроксикислоты. Таким образом, выявление и характеристика ферментов CYP74 у организмов различных таксонов представляет собой перспективную и крайне интересную задачу. В связи с вышесказанным, актуальность темы рассматриваемой диссертационной работы, которая посвящена изучению структурно-функциональных свойств эпоксиалкогольсинтазы CYP5164B1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*, не вызывает сомнений.

Научная новизна, теоретическое и практическое значение. В диссертационной работе Фатыховой В.С. описан впервые выделенный в геноме бурой водоросли *E. siliculosus* ген фермента клана CYP74, ответственного за синтез оксипинов – эпоксиалкогольсинтазы EsEAS (CYP5164B1). Рекомбинантный белок EsEAS был получен и охарактеризован. В работе было показано, что фермент EsEAS катализирует превращение 9-гидроперекиси линолевой кислоты в 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценую кислоту, в основном, (9*S*,10*S*,11*S*)-эпимер с *транс*-эпоксидным кольцом. 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.

Впервые с помощью сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы дивинилэфирсинтазы NtDES (CYP74D3) табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum*) с измененными механизмами каталитического действия. Мутантная

форма NtDES V379F катализирует образование продукта алленоксидсинтазной реакции, в то время как продукты дивинилэфирсинтазной и гидропероксидлиазной реакций образуются в следовых количествах. Мутантная форма NtDES V379C катализирует образование продуктов алленоксидсинтазной, гидропероксидлиазной, дивинилэфирсинтазной и эпоксиалкогольсинтазной реакций.

В диссертационной работе Фатыховой В.С. впервые выявлены продукты эпоксиалкогольсинтазной активности в талломах представителей бурых водорослей: *Saccharina cichorioides*, *Sargassum pallidum*, *Coccophora langsdorfi* и *Pilaella littoralis*.

Разработанные системы получения и препаративной очистки цитохромов растений, описанные в работе, могут быть применены в промышленности. Качественное изменение ферментативного катализа при сайт-направленном мутагенезе представляет потенциальный интерес для практического использования в биоинженерии. Результаты диссертационной работы Фатыховой В.С. могут способствовать разработке алгоритмов направленной модификации белков с целью получения ферментов с заданными свойствами. Охарактеризован фермент, катализирующий образование оксилипинов, обладающих антимикробными свойствами – эпокиспиртов и тригидрокси-кислот.

Общая оценка работы. Диссертация построена по классической схеме, с соблюдением стандартной структуры. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста, включает 7 таблиц и 44 рисунка. список цитированной литературы содержит 246 ссылок на статьи и сайты интернета с базами данных и программами для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. По теме диссертации опубликовано 3 научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК, в том числе 2 – в авторитетных рецензируемых зарубежных журналах. 17 работ, опубликованных в материалах российских и международных научных мероприятий, указывают на активность диссертанта и достаточно широкую и полную апробацию полученных результатов в научных

кругах. Автореферат и публикации автора полностью отражают содержание диссертации.

Диссертационная работа хорошо оформлена, логично и последовательно изложена. Язык изложения не вызывает нареканий, опечатки практически отсутствуют. Обзор литературы полно отражает состояние проблемы. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Для решения задач диссертационной работы Фатыхова В.С. применила комплекс современных методов биохимии, молекулярной биологии и биоинформационного анализа.

Достоверность научных исследований и выводов обеспечена достаточным объемом экспериментального материала, применением широкого спектра современных методов исследования, их соответствием поставленной цели и задачам.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе Фатыховой В.С., могут быть использованы в учреждениях биологического, биотехнологического, сельскохозяйственного и медицинского профилей, занимающихся получением рекомбинантных ферментов, исследованием взаимосвязи структуры и функций белков, а также в учебном процессе при чтении в ВУЗах курсов лекций по биохимии, физиологии растений и молекулярной биологии.

Все сказанное позволяет положительно оценить представленную диссертационную работу. Принципиальных возражений и замечаний не имеется. В качестве минорного замечания хотелось бы отметить, что в третьей главе при описании полученных результатов приводятся излишние подробности о применяемых методах и приборах, так как эти сведения уже приведены ранее в методической части. Кроме того в тексте диссертации отсутствует обоснование того, что в исследовании был использован синтетический ген искомого фермента. Остается неясным, почему такой подход оказался предпочтительным по сравнению с получением кДНК искомого гена в реакции обратной транскрипции на матрице РНК из талломов *Ectocarpus siliculosus*. Исходя из этого, возникает также вопрос о подтверждении соответствия рекомбинантного белка имеющемуся природному прототипу.



Заключение. Диссертация В.С. Фатыховой «Структурно-функциональные свойства эпоксиалкогольсинтазы СУР5164В1 бурой водоросли *E. siliculosus*» является самостоятельной законченной научной квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в область исследований, связанных с пониманием механизмов каталитических превращений гидроперекисей жирных кислот и представлением об эволюции ферментов СУР74.

Актуальность темы, достоверность результатов и их новизна, обоснованность и четкость сделанных выводов, значительный объем проведенных экспериментальных исследований позволяют сделать заключение о том, что данная работа полностью соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Фатыхова Валерия Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – биохимия и физиология растений.

Работа и ее результаты обсуждены на заседании лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ РАН, протокол № 1 от 06.03. 2017 года.

Заведующая лабораторией экологической  
биотехнологии ИБФРМ РАН  
доктор биологических наук, профессор

О.В. Турковская

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов  
Российской академии наук (ИБФРМ РАН)  
410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, 13  
Тел.: +7 8452 970444  
e-mail: turkovskaya\_o@ibppm.ru

Подпись Ольги Викторовны Турковской ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ИБФРМ РАН

к.б.н.



Т.Е. Пылаев