

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Топорковой Яны Юрьевны

**ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ КЛАНА CYP74 – НОВЫЕ  
УЧАСТНИКИ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА**", представленной на  
соискание учёной степени доктора биологических наук  
по специальности 1.5.21. - физиология и биохимия растений

Диссертационная работа Топорковой Я. Ю. посвящена выявлению у растений группы ферментов, способных катализировать образование эпокиспиртов, анализу их биосинтеза и изучению их структурно-функциональных характеристик. Актуальность проведения исследований в данном направлении диктуется важностью и значимостью работ, направленных на выявление особенностей окисления полиненасыщенных жирных кислот, в частности, превращения гидроперекисей жирных кислот в эпокиспирты. Именно этот аспект биохимических реакций, осуществляемых растительными клетками, менее всего изучен. Таким образом, получение новых данных о растительных ферментах, проявляющих эпоксиалькогольсинтазную активность, представляет большой интерес, актуально и значимо не только с точки зрения фундаментальной науки, но и открывает широкие перспективы для практического приложения, поскольку продукты исследуемого диссертантом биосинтетического пути являются источником важнейших биорегуляторов, играющих важную роль в ответных реакциях растений на стрессовые воздействия. Следует подчеркнуть, что именно эта проблема привлекает пристальное внимание исследователей ведущих лабораторий мирового научного сообщества в последние годы.

С привлечением различных баз данных диссертантом проведен глубокий биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей ферментов семейства CYP74 среди видов растений, у которых обнаружены эпоксигидрокси-производные жирных кислот. Полученные данные послужили основой для определения потенциальных эпоксиалькогольсинтаз, представляющих интерес для дальнейших исследований. Важно подчеркнуть, что диссертантом сделан акцент на получение рекомбинантных белков – аналогов исследуемых целевых ферментов с применением технологий рекомбинантных ДНК. Получение рекомбинантных ферментов, соответствующих целевым растительным аналогам, позволило охарактеризовать их каталитические свойства на очищенных препаратах. Данные работы являются пионерскими и выполнены диссертантом впервые, поскольку ранее гены продуктов эпоксиалькогольсинтазной ветви у растений клонированы не были, соответственно не были и охарактеризованы их продукты. На примере различных видов организмов диссертантом проведен сравнительный анализ каталитических свойств полученных ферментов, что внесло несомненный вклад в расшифровку механизмов их каталитического действия. С применением подхода сайт-направленного мутагенеза диссертантом показана возможность модуляции каталитических свойств у

ферментов семейства СУР74, что заслуживает пристального внимания в плане практического использования данного подхода для получения биологически активных оксипинов, как средств защиты важных сельскохозяйственных видов растений, а также для биофармацевтики.

Автореферат достаточно ёмкий и даёт полное представление о проделанной работе, выводы соответствуют поставленным задачам. Список публикаций по теме диссертации имеет необходимый научный вес – 22 научные статьи, опубликованные в изданиях, цитируемых в базах данных Scopus, часть из которых относится к Q1, что еще раз свидетельствует о значимости и актуальности выполненной диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Топорковой Я. Ю. «Эпоксисалкогольшинтазы клана СУР74 – новые участники липоксигеназного каскада» полностью соответствует критериям ВАК, опубликованным в "Положении о порядке присуждения учёных степеней", а её автор, Топоркова Яна Юрьевна, заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. - физиология и биохимия растений.

Дейнеко Елена Викторовна,  
доктор биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика,  
профессор, главный научный сотрудник, зав. лабораторией  
биоинженерии растений

/Дейнеко Е.В./

Федеральное государственное бюджетное научное  
учреждение «Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН»  
пр-т академика Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск  
+7-913-740-8108  
эл.почта:deineko@bionet.nsc.ru

Подпись д.б.н., проф. Дейнеко Е.В. заверяю:

Орлова Галина Владимировна  
Ученый секретарь  
ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»  
кандидат биологических наук

/Орлова Г.В./

04 октября 2022 г.





## Отзыв

на автореферат диссертации Яны Юрьевны Топорковой «**ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ КЛАНА CYP74 – НОВЫЕ УЧАСТНИКИ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА**», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21 – «физиология и биохимия растений»

Диссертационная работа Яны Юрьевны Топорковой связана с актуальными проблемами физиологии и биохимии растений, а именно, (1) с выяснением фундаментальных основ функционирования липоксигеназного каскада хозяйственно значимых культурных растений и модельных организмов; и (2) получением приоритетных данных о новых оксипипинах, механизмах их биосинтеза, в том числе сигнальных соединений, которые могут быть ответственны за адаптацию организмов к действию неблагоприятных факторов. Согласно текущему мнению, для решения таких проблем необходимо научное обоснование, которое должно базироваться на результатах комплексного анализа растительного материала, оцененного современными физиолого-биохимическими и молекулярно-биологическими методами. И именно такие широкомасштабные исследовательские работы позволят расширить возможности получения биологически активных оксипипинов, например, как средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений, а также в качестве фармацевтических препаратов нового поколения.

Замысел данной работы основан на научном предположении, что у растений, у которых обнаружены эпокиспирты, функционируют и продукты эпоксиалкогольсинтазной активности, т.е. ферменты их биосинтеза, что позволяет детальное изучение их структурно-функциональных свойств, и, как следствие, внесет вклад в понимание функционирования липоксигеназного каскада растений в целом.

Задачи исследования включали: (1) *in silico* анализ аминокислотных последовательностей ферментов семейства CYP74 растений, у которых выявлены эпоксигидроксипроизводные жирных кислот, для определения потенциальных эпоксиалкогольсинтаз; (2) клонирование генов, получение очищенных препаратов соответствующих рекомбинантных ферментов с последующей характеристикой каталитических свойств полученных ферментов; (3) сопоставление каталитических свойств полученных ферментов и родственных ферментов различных видов организмов и (4) расшифровка механизма каталитического действия полученных ферментов.

Описание и обсуждение решений вышеизложенных задач составляет основу автореферата диссертации Яны Юрьевны. Аналитическое рассмотрение диссертации позволяет заключить следующее: автором была предпринята серия экспериментов, спланированных на высоком профессиональном уровне, которые позволили полностью



решить поставленные в ходе работы задачи. Яной Юрьевной Топорковой использован целый арсенал классических и современных высокоразрешающих методов, применяемых в мировой практике физиолого-биохимических и молекулярных исследований.

Впечатляет и список культур, выбранных автором как объектов для исследований: огурец (*Cucumis sativus* L.), картофель (*Solanum tuberosum* L.), соя (*Glycine max* L.), дыня (*Cucumis melo* L.), люцерна (*Medicago truncatula* Gaertn.), табак (*Nicotiana tabacum* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L.), морковь (*Daucus carota* L.), лен-долгунец (*Linum usitatissimum* L.), лютик японский (*Ranunculus japonicus* Thunb.), плаунок *Selaginella moellendorffii* Hieron, роющая литоральная актиния (*Nematostella vectensis* Stephenson, 1935) и бурая водоросль *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye, 1819.

На основе обширных экспериментальных данных охарактеризован ряд эпоксиалкогольсинтаз у растений и животных, а также значительно большее число ферментов с другими типами каталитической активности – алленоксидсинтаз, гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз, проявляющих эпоксиалкогольсинтазную активность в качестве дополнительной. Проведены исследования их структуры, механизмов каталитического действия, а также филогении, показавшие в том числе, что растительные эпоксиалкогольсинтазы и ферменты, проявляющие эпоксиалкогольсинтазную активность, относятся к семейству CYP74, в то время как нерастительные ферменты относятся к другим семействам, входящим совместно с семейством CYP74 в клан CYP74. Крайне важными и актуальными представляются результаты исследований по установлению закономерности проявления дополнительной эпоксиалкогольсинтазной активности у ферментов CYP74 разных подсемейств: у ферментов CYP74C, описанных ранее как гидропероксидлиазы, эпоксиалкогольсинтазная активность, как правило, является одной из двух основных наравне с гидропероксидлиазной, тогда как у ферментов CYP74B и CYP74D эпоксиалкогольсинтазная активность является дополнительной минорной активностью. Подходы и решения, предложенные Яной Юрьевной Топорковой, позволили установить механизм эпоксиалкогольсинтазной реакции, и убедительно продемонстрировать, что этот механизм протекает через (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировку образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинацию эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт. Таким образом, установить, что эпоксиалкогольсинтазы являются изомерами.

В целом, диссертационная работа Яны Юрьевны весьма обширна по представленным результатам, которые оформлены в рисунки, достоверность результатов не вызывает сомнений. Основные положения и результаты исследований по диссертации опубликованы в 22 научных статьях. Большинство статей соискателя







## Отзыв

на автореферат диссертации Топорковой Яны Юрьевны  
«Эпоксисалкогольшинтазы клана CYP74 – новые участники липоксигеназного  
каскада», представленной на соискание ученой степени доктора  
биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия  
растений

Диссертационная работа Топорковой Я.Ю. посвящена обнаружению и изучению каталитических свойств нового типа ферментов липоксигеназного пути растений, а именно, - эпоксиалкогольшинтаз. Актуальность исследования не вызывает сомнений, поскольку до настоящей работы у растений не было описано ни одного фермента с эпоксиалкогольшинтазной активностью, несмотря на присутствие в тканях эпокиспиртов – продуктов эпоксиалкогольшинтазной ветви. В целом, эпоксиалкогольшинтазная ветвь является наименее изученной из всего липоксигеназного каскада. Выявление и изучение свойств эпоксиалкогольшинтаз позволяет получить ценную информацию о путях биосинтеза эпокиспиртов и тригидрокси-кислот – группе метаболитов, выполняющих важные функции в растениях, но остающихся крайне слабо изученными. Второй слабо изученной ветвью липоксигеназного пути является дивинилэфирсинтазная, направленная на биосинтез антимикробных и фунгицидных дивиниловых эфиров, в представленной работе также посвящена значительная часть. Таким образом, и практическая значимость данной работы не вызывает сомнений.

Члены семейства ферментов цитохрома P450 CYP74 специализируются на превращении гидроперекисей и играют важную роль в метаболизме оксипинов, которые является одним из основных защитных механизмов, используемых растениями. С использованием современных методов молекулярной биологии, биохимии и биофизики в диссертационной работе впервые показано, что некоторые ферменты CYP74 проявляют двойную активность гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольшинтазы в зависимости от используемого субстрата. Дополнительную эпоксиалкогольшинтазную активность проявляет ряд цитохромов P450 клана CYP74, описанных или аннотированных ранее как алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы и дивинилэфирсинтазы. Кроме того, у некоторых объектов выявлены истинные эпоксиалкогольшинтазы. Для ряда ферментов исследована взаимосвязь первичной структуры и каталитических свойств с помощью сайт-направленного мутагенеза. Полученные результаты работы по сайт-направленному мутагенезу представляют потенциальный интерес для

практического использования в биоинженерии.

Автореферат дает достаточно полное представление о выполненной работе. Использованные в работе классические и современные методы и подходы физиологии растений, биохимии, биофизики и молекулярной биологии адекватны поставленным задачам. Полученные выводы соответствуют задачам. Список публикаций по теме диссертации включает 22 научные статьи, опубликованные в базах данных WoS и Scopus, значительная часть которых относится к Q1, что свидетельствует о значимости выполненной диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Топорковой Я.Ю. «Эпоксисамоксилирование клана CYP74 – новые участники липоксигеназного каскада» полностью соответствует критериям ВАК, опубликованным в «Положении о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Топоркова Яна Юрьевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений.

В.И. Светашев

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник,  
Лаборатории сравнительной биохимии,  
Национальный научный центр  
морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,  
Владивосток 690041, Россия  
e-mail: vsvetashev@mail.ru

*Светашев*



подпись *В.И. Светашев*  
Заверяю: *Вед. спец.* ОДО  
*Общественная*

*Вед. спец.*

## **ОТЗЫВ**

на автореферат диссертации Топорковой Яны Юрьевны  
**«ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ КЛАНА CYP74 – НОВЫЕ  
УЧАСТНИКИ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА»**, представленной на  
соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности  
1.5.21. – физиология и биохимия растений

Окисление полиненасыщенных жирных кислот является источником важнейших биорегуляторов – оксипинов, играющих значительную роль в регуляторных процессах, а также ответных реакциях на изменение условий окружающей среды. Основным источником оксипинов у растений является липоксигеназный каскад. При этом наиболее изученными растительными оксипинами являются жасмонаты, травматин и летучие соединения – продукты алленоксидсинтазной и гидропероксидлиазной ветвей липоксигеназного каскада. Гораздо меньшее внимание уделяется другим ветвям липоксигеназного каскада, в том числе образованию эпоксигидрокси-производных (эпоксиспиртов), несмотря на то что эти соединения обнаружены у организмов, принадлежащих к разным таксонам. У растений, несмотря на присутствие продуктов эпоксиалкогольсинтазной ветви, эпоксиалкогольсинтазы не были описаны. Именно обнаружению эпоксиалкогольсинтаз и ферментов, проявляющих эпоксиалкогольсинтазную активность наряду с другим типом активности, и описанию их каталитических свойств посвящена диссертационная работа Топорковой Я.Ю. Таким образом, актуальность исследования не вызывает сомнений.

Использованные в работе классические и современные методы и подходы физиологии растений, биохимии, биофизики и молекулярной биологии соответствуют поставленным задачам. Клонировано большое число генов ферментов CYP74 и охарактеризованы соответствующие рекомбинантные белки; сходные каталитические свойства показаны на многих гомологичных белках. В работе впервые выявлены истинные эпоксиалкогольсинтазы у растений и организмов, принадлежащих разным таксонам. Кроме того, показано, что некоторые ферменты CYP74 проявляют



двойную активность гидропероксидазы и эпоксиалкогольсинтазы в зависимости от используемого субстрата. Дополнительную эпоксиалкогольсинтазную активность проявляет ряд цитохромов P450 клана CYP74, описанных или аннотированных ранее как алленоксидсинтазы, гидропероксидазы и дивинилэфирсинтазы.

С помощью сайт-направленного мутагенеза в работе экспериментально подтверждены возможности взаимопревращения ферментов внутри семейства CYP74 в результате одной или нескольких замен в каталитически важных сайтах, что позволило сделать предположение о происхождении и эволюции этих ферментов.

К тексту автореферата имеется несколько замечаний. Автору не удалось избежать неудачных выражений, например, на стр. 17 написано «по результатам анализа продуктов инкубации», на мой взгляд, было бы лучше написать «по результатам анализа продуктов реакции». Хотелось бы в автореферате видеть количественный анализ продуктов реакции, таблицу очитки ферментов, выход, удельную активность, физико-химические свойства полученных ферментов, молекулярную массу, данные электрофореза. Возможно, все эти сведения содержатся в тексте диссертации.

Автореферат дает полное представление о диссертационной работе. Полученные выводы соответствуют поставленным задачам. Соискатель имеет 22 работы по теме диссертации, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных информационно-аналитических системах научного цитирования, входящих в перечень журналов, рекомендованных ВАК, что свидетельствует о высоком уровне представленной диссертационной работы. В большинстве работ Топоркова Я.Ю. является первым автором или автором для переписки.

Таким образом, диссертационная работа Топорковой Я.Ю. «Эпоксиалкогольсинтазы клана CYP74 – новые участники липоксигеназного каскада» полностью соответствует критериям ВАК, опубликованным в «Положении о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор,



Топоркова Яна Юрьевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений.

Кусайкин Михаил Игоревич  
Доктор биологических наук, доцент  
Ведущий научный сотрудник  
лаборатории химии ферментов,  
заместитель директора по научной работе  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Тихоокеанский институт  
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова  
Дальневосточного отделения Российской  
академии наук

25.10.2022

