

## О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Топорковой Яны Юрьевны «ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ КЛАНА CYP74 – НОВЫЕ УЧАСТНИКИ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений

### Актуальность проблемы

Окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) является источником важнейших биорегуляторов – оксилипинов, играющих значительную роль в регуляторных процессах. У млекопитающих продукты окислительных превращений жирных кислот состава C<sub>20</sub> контролируют работу органов пищеварения, сердечно-сосудистой и респираторной систем, воспроизводства, участвуют в воспалительных процессах, анафилаксии, системах иммунного ответа и др. Окислительный метаболизм ПНЖК у растений менее хорошо изучен. Основным источником оксилипинов у растений является липоксигеназный каскад, начинающийся с образования гидроперекисей жирных кислот при участии липоксигеназ. Дальнейший метаболизм гидроперекисей контролируется рядом ферментов, включая неклассические цитохромы P450 (CYP74). Из ферментов CYP74 наиболее распространены алленоксидсинтазы (АОС) и гидропероксидлиазы (ГПЛ). Они обнаружены у всех изученных к настоящему времени цветковых растений. Гораздо реже встречаются другие представители данного семейства белков – дивинилэфирсинтазы (ДЭС). Физиологические свойства оксилипинов растений изучены крайне односторонне, при этом наибольший приоритет ранее отдавался жасмонатам, травматину и летучим соединениям. Гораздо меньшее внимание было уделено образованию эпокиспиртов и тригидроксикислот. Несмотря на значительный интерес исследователей к ферментам CYP74 (десятки охарактеризованных ферментов и продуктов их каталитического действия), эпоксиалкогольсинтаза VfEAS (CYP440A1) является до сих пор единственным представителем этой группы

ферментов. Эта группа является широко распространенной в силу того, что продукты эпоксиалкогольсинтазной ветви выявляются у многих видов организмов. У растений, несмотря на присутствие продуктов эпоксиалкогольсинтазной ветви, до настоящего времени гены эпоксиалкогольсинтаз не были клонированы, и соответствующие белки не были охарактеризованы.

Таким образом, диссертационная работа Я.Ю. Топорковой посвящена актуальной проблеме исследований структурных и каталитических свойств эпоксиалкогольсинтаз растений СУР74 – новых участников липоксигеназного каскада.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В представленной диссертационной работе ясно сформулированы цели и задачи исследования, которые были решены при выполнении исследования. Выводы диссертации вытекают из полученных результатов и обоснованы. Достоверность полученных результатов подтверждается рационально выбранными методами для решения соответствующих задач, достаточным объемом материала, использованием адекватных методов обработки данных.

### **Общая характеристика, структура и оформление диссертации**

Диссертационная работа Я.Ю. Топорковой построена по классическому принципу, имеет объем 438 страниц текста, документирована 136 рисунками и 26 таблицами, включает 623 ссылки на литературные источники и содержит разделы: «Введение», где изложены цели и задачи работы; главу 1 - «Литературный обзор» (97 страниц); главу 2 - «Материалы и методы исследования»; главу 3 - «Результаты и обсуждения»; «Заключения»; «Выводы»; «Список литературы» и раздел «Приложение», который содержит технические данные, полученные в ходе работы и дополнительный иллюстративный материал.

**В вводной части,** автор дает чёткое обоснование актуальности исследования, подчеркивая фундаментальное и прикладное значение

исследований, благодаря которому выявление и характеристика эпоксиалкогольсинтаз позволяет получить необходимую информацию о путях биосинтеза эпокиспиртов и тригидроксикислот – группе метаболитов, выполняющих важные функции в масличных, зерновых и технических культурах и лекарственных растениях, а оптимизация каталитических свойств этих ферментов с помощью сайт-направленного мутагенеза, рационального и полурационального инженерного подхода представляет интерес для практического использования в биоинженерии. Соискатель **формулирует цель исследования**, которая заключается в изучении механизмов биосинтеза эпокиспиртов растений – продуктов эпоксиалкогольсинтазной активности, выявление ферментов их биосинтеза, изучение их структурно-функциональных свойств, а также проведение филогенетических исследований в ряду полученных ферментов каскада.

**Научная новизна и практическая значимость работы** сформулированы предельно четко. Приведены данные по апробации работы и публикациям. В автореферате также указана связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования, а также дана информация о лабораториях, совместно с которыми проводилось выполнение некоторых экспериментов, результаты которых вошли в рассматриваемую диссертационную работу.

**Обсуждение результатов и литературных данных.** Эта часть диссертации включает в себя как литературный обзор (глава 1), так и главу 4, посвященные результатам и их обсуждениям. Первая глава «Литературный обзор», разбита на 21 подраздел, содержат литературные данные, отражающие состояние развития науки в изучаемой области. Особое внимание автор диссертации уделяет имеющейся информации о путях биосинтеза основных классов оксипиринов растений под действием различных ферментативных систем, включая ферменты семейства CYP74, а также основным тенденциям в данной области исследований.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» представлена подробная характеристика, материалов и методов исследования. Эта часть разбита на

подразделы, описывающие материалы и все использованные методы, соответствующие определенным этапам работы. Следует отметить, что приведенные Я.Ю. Топорковой описания экспериментов достаточно полны для их воспроизведения и свидетельствуют о том, что диссертационная работа выполнена на высочайшем экспериментальном уровне с применением современных методов ботаники, биохимии, молекулярной энзимологии, биоинформатики и методов физико-химического анализа. Поэтому к несомненным достоинствам работы следует отнести высокий методический уровень работы. Использование комплексного анализа позволило автору получить значимые научные результаты.

Глава 3 части диссертации «Результаты и обсуждения», состоящая из 22-х подразделов и представленная на 187 страницах, посвящена получению рекомбинантных ферментов CYP74C1\_CS и CYP74C31 огурца, фермента CYP74B33 моркови, CYP74B16 льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) и CYP74Q1 лютика едкого (*Ranunculus acris*), CYP74M1, CYP74M2 и CYP74M3 плаунка *Selaginella moellendorffii*, CYP74A88 лютика японского (*Ranunculus japonicus*), CYP5164B1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*, CYP443D1 и CYP443C1 роющей литоральной актинии *Nematostella vectensis*, CYP440A18 ланцетника азиатского, а также ряда ферментов CYP74C2, CYP74C4\_ST, CYP74C13\_GM, CYP74C13\_MT и CYP74C43; алленоксидсинтаз подсемейств CYP74A и CYP74C дивинилэфирсинтаз подсемейства CYP74D и изучению их каталитических свойств. В завершении проведены филогенетические исследования в ряду ферментов CYP74. Необходимо отметить высокий уровень иллюстраций, приведенных в данном разделе. Приведенные рисунки являются убедительным документальным подтверждением соответствующих этапов работы, проведенных с использованием различных методик. В работе представлены важные научные открытия, относящиеся к физиологии и биохимии растений, а также смежным областям. Таким образом, представляется правомерным предоставление работы к защите по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Можно особо отметить, что знакомство с этими частями диссертации позволяет сделать вывод о большой эрудиции автора диссертационной работы. Очевидно, что автор диссертационной работы активно общается с коллегами, владеет самой последней и актуальной информацией в своей области, а в ходе написания этих частей диссертации фактически провел отдельное исследование, преследующее цель максимально подробно собрать воедино и изложить самое современное и полное состояние интересуемой области науки. Эти части диссертации, безусловно, интересны для специалистов, которые пожелают продолжать работу в данном направлении.

За разделом «Результаты и обсуждения» (Глава 3) следует раздел «Заключение», в котором кратко представлено осмысление проделанной работы, а также «Выводы», которые прекрасно сформулированы и логично вытекают из представленных в диссертации данных.

Диссертация написана хорошим литературным языком, а текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены корректно. Диссертационное исследование по своему содержанию соответствует заявленной специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений. Характеризуется следующими пунктами паспорта специальности утвержденного ВАК: *п.6.* сигнальные системы клеток и целых растений, рецепция и трансдукция внутренних и внешних сигналов (фоторецепция, гормональная, гуморальная и биоэлектрическая регуляция); *п.7.* вторичный метаболизм растений, структура и биосинтез клеточной стенки; *п. 11.* сравнительная биохимия и эволюция растений.

Автореферат соответствует всем требованиям, предъявляемым к подобным работам, дает полное представление о структуре, объеме и содержании диссертации. Материалы, полученные при выполнении данной диссертационной работы приведены в списке литературы и, отдельно, в автореферате, изложены в 22 публикациях, 16 из которых опубликованы в престижных высокорейтинговых научных международных изданиях, а также неоднократно докладывались на

различных престижных конференциях и конгрессах. Количество и качество публикаций отражает наивысочайший уровень проведенных исследований.

Диссертационная работа Я.Ю. Топорковой **не вызывает существенных замечаний**. Однако следует отметить некоторые моменты:

Общие замечания:

- несмотря на то, что в диссертационной работе присутствуют устоявшиеся латинские аббревиатуры и сокращения, например, такие как СУР для сокращенного обозначения прочих ферментов, таких как липоксигеназа, циклооксигеназа и др., а также продуктов окисления полиненасыщенных кислот используется кириллица. Учитывая, что подавляющее большинство из 623 ссылок на литературные источники принадлежит к англоязычному сегменту научной литературы, удобнее было бы использовать латинские сокращения. Напротив, сокращения кириллицей несколько затрудняют восприятие материала;
- не совсем привычно использование в диссертации текстовых ссылок на литературные источники, хотя в списке литературы присутствует сплошная цифровая нумерация. Текстовые ссылки используются в ряде зарубежных периодических изданий, тогда как для диссертационных работ более типичной была бы сплошная цифровая нумерация;
- для биотехнологического получения ферментов группы СУР были использованы различные векторы, такие как рЕТ-23а, рЕТ-32, рЕТ-40b, однако причины выбора определенной плазмиды в каждом конкретном случае не уточняются;
- на стр. 158 в тексте для сравнения количества продуктов превращения 9-ГПОТ под действием фермента СУР74С1\_CS (рис. 51Б) используется высота пика, хотя в этом случае правильнее использовать площади пиков;
- автором диссертации проведен огромный блок работ по получению мутантных форм СУР74 растений с помощью сайт направленного мутагенеза аминокислот, принадлежащих критическим последовательностям в структуре фермента и изучению их каталитических

свойств. Так, например, в разделе 3.22 главы 3 автор показывает, что «результаты работы однозначно демонстрируют, что последовательность сайта «F/L toggle» (CPC-1), участка перегиба I-спирали (CPC-4) и ERR-триады определяет тип катализа CYP74. Совокупность этих доменов можно рассматривать как своеобразные «отпечатки пальцев» ферментов CYP74, позволяющие (как правило) предсказать тип катализа по последовательности. Хотелось бы, чтобы подобные выводы были подвергнуты систематизации не только в текстовом, но и в графическом формате, который бы отражал влияние каждого из исследованных положений на тип ферментативной активности с точки зрения структура-функция;

Замечания по стилю:

- стр. 9 «...ферменты, сходные с представителями семейства CYP74...» очень неудачная фраза. Возможно автор имела ввиду сходные по своей функциональности ферменты;
- стр. 18 «...они обеспечивают костный метаболизм...» очень неудачная фраза. Возможно автор имела ввиду метаболизм в костной ткани;
- стр. 23 «...Окисляемость линолевой,  $\alpha$ -линоленовой, арахидоновой и докозагексаеновой кислот прямо пропорциональна количеству присутствующих бис-аллильных положений...». В этом предложении автору следовало лучше использовать термин бис-аллильных метиленовых звеньев.
- стр. 35-36 «... $\alpha$ -ДОГ представляют собой белки, содержащие гем – простетическую группировку, фундаментальную для всех аэробных форм жизни». Слово «фундаментальную» представляет собой англицизм и не совсем уместно в данном контексте предложения;
- стр. 87-88 «...в результате гомолитического разрезания гидроперекисной группировки» неудачная фраза. Лучше было бы использовать термин «гомолитического разрыва»;

- стр. 90 «Хотя гидроперекиси разрезаются кислотой Льюиса в непротонированном растворителе, протонированные кислоты (например, серная кислота) в протонированном растворителе (вода) смещают реакцию к образованию в основном эпокиспиртов (рис. 34) и продуктов их гидролиза – тригидроксикислот (Gardner et al., 19846)». Учитывая первоисточник, в данной фразе речь, по-видимому, идёт о протонном и апротонном растворителе;
- стр. 140 в фразе «Оксилипины – это обширная группа окисленных производных жирных кислот, разнообразных по своей структуре» вместо слова разнообразных следовало бы использовать слово «отличающихся»;
- стр. 304 в фразе «При этом основной алленоксидсинтазный продукт, -кетол 8, не выявлялся» используется неудачное выражение. Лучше использовать выражение «алленоксидсинтазный продукт не был обнаружен».

#### Мелкие опечатки:

- стр. 61 – опечатка в слове 9-оксононановая кислота;
- стр. 74 – В тексте ссылка на рисунки 23а, 25а и б содержит строчные буквы, а в легенде к рисунку они обозначены заглавными. Такая же опечатка присутствует на стр. 75;
- стр. 95 – имеются опечатки в легенде к рис. 37.

#### Заключение

Высказанные замечания носят исключительно рекомендательный характер и не ставят под сомнение суть представленных в диссертации результатов и не умаляют значимости этого диссертационного исследования. Диссертационная работа Топорковой Яны Юрьевны «ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ КЛАНА СУР74 – НОВЫЕ УЧАСТНИКИ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА», является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, которые можно квалифицировать как крупное научное достижение. По актуальности, научной



новизне, практической значимости, достоверности результатов диссертационная работа Я.Ю. Топорковой соответствует требованиям, установленным пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 1690 от 26.09.2022 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а также паспорту специальности «1.5.21 – физиология и биохимия растений». На основании вышесказанного, Топоркова Яна Юрьевна, несомненно, заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент —  
Иванов Игорь Владимирович

профессор кафедры Химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет», доктор химических наук

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:  
02.00.10 – Биоорганическая химия

Адрес: 119571, Москва, пр. Вернадского 86. Тел: +7 (985) 421 49 24

Адрес электронной почты: ivanov\_i@mirea.ru

«30» сентября 2022 года

И.В. Иванов

Подпись И.В. Иванова заверяю

Заместитель первого проректора  
РТУ-МИРЭА



Ю.А. Ефимова