

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН)

**Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук
(ИФПБ РАН)**

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Топорковой Яны Юрьевны «Эпоксидалькогильсинтазы клана CYP74 – новые участники липоксигеназного каскада», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. – «физиология и биохимия растений».

В диссертационной работе Топорковой Яны Юрьевны представлено фундаментальное исследование ферментов CYP74 из разных организмов, охватывающее анализ более двух десятков ферментов пути биосинтеза окислипинов. В описанных исследованиях были идентифицированы ферменты, ответственные за формирование эпокиспиртов, обнаружены истинные эпоксиалькогильсинтазы, а также выявлена ферментативная активность, ведущая к образованию эпокиспиртов, у алленоксидсинтаз, гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз. Актуальность данного направления исследований заключается в том, что, несмотря на повсеместное присутствие продуктов эпоксиалькогильсинтазной ветви у многих видов организмов, до настоящего времени ферменты, ответственные за образование этих продуктов, не были изучены. Наличие эпоксиалькогильсинтазной активности у ряда ферментов CYP74 позволило объяснить отсутствие эпоксиалькогильсинтаз у некоторых растений, содержащих эпокиспирты. С помощью сайт-направленного мутагенеза генов ферментов семейства CYP74 были выявлены основные детерминанты, определяющие функциональные свойства ферментов, и

осуществлено превращение одних ферментов в другие. Теоретическая значимость работы велика, так как цикл работ, опубликованных по результатам исследований, описанных в диссертационной работе, изменил наш взгляд на ферменты СУР74, осуществляемые ими механизмы каталитических превращений, и их эволюцию.

Научная новизна и оригинальность представленной работы несомненны. В работе идентифицированы ранее не описанные ферменты пути биосинтеза оксипинов в объектах, эволюционно удаленных, включая высшие растения, бурые водоросли, животные, выяснены механизмы каталитического действия, расшифрованы структуры образованных продуктов. Все представленные результаты – это новые данные, обогатившие мировую науку. В совокупности приведенные данные, без преувеличения, представляют собой существенный вклад в понимание пути биосинтеза оксипинов. Они, как справедливо отмечено, “расширяют список охарактеризованных ферментов СУР74 и усложняют действующую классификацию”, дополняют и уточняют схему механизма каталитического действия ферментов семейства СУР74, проливают свет на их эволюционное происхождение.

Оксипины проявляют высокую биологическую активность как в растительной, так и в животной клетке, поэтому эти соединения находят все более широкое применение в сельском хозяйстве и медицине. В связи с этим, работа Топорковой, посвященная изучению ферментов биосинтеза оксипинов в разных организмах, имеет практическую значимость, а результаты обсуждаемых исследований могут найти применение в разработке биотехнологических методов получения разнообразных оксипинов.

Цели и задачи диссертационной работы, представленной к защите, ясно сформулированы, в ходе выполнения работы полностью решены. Выводы диссертации полностью обоснованы и вытекают из полученных результатов. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения, поскольку подтверждается использованием адекватных методов для решения соответствующих задач и достаточным объемом полученного материала.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа оформлена традиционно, изложена на 438 страницах, включает 136 рисунков и 26 таблиц, дополнена приложением, содержащим информацию об использованных праймерах, последовательностях изучаемых белков, данные ^1H -ЯМР анализа. Список цитированной литературы содержит 623 ссылки. Обзор литературы включает современные данные о путях образования оксипиринов в растениях и других организмах, ферментах, вовлеченных в биосинтез этих соединений. Важно, что литературный обзор, как и сами исследования, сфокусирован на вопросах, которые часто остаются за рамками интересов других научных групп: проведен глубокий анализ литературных данных по эпоксиалкогольсинтазам, довольно подробно рассмотрены ферменты и реакции, связанные с превращениями 9-гидроксипроизводных жирных кислот.

В разделе «Объекты и методы исследования» описаны методы биоинформатики, молекулярной биологии, биохимии, химического анализа. Описание методов содержит все необходимые объяснения и техническую информацию.

Глава «Результаты и Обсуждение» включает несколько подглав, описывающих изучение индивидуальных ферментов, в общей сложности около 25 ферментов из разных организмов. Для каждого фермента была проведена работа по клонированию открытых рамок считывания, экспрессии в *E. coli* и очистке рекомбинантных белков. Были идентифицированы продукты реакций, оценена субстрат-специфичность исследуемых ферментов, и изучены кинетические параметры ферментативных реакций. Среди исследованных генов были гены из несеквенированных объектов, например, лютика едкого (*Ranunculus acris* L.). Для клонирования этих генов были использованы подходы, основанные на применении вырожденных праймеров или процедуры RACE.

В ходе исследований было выявлено неожиданное разнообразие дивинилэфирсинтаз, подробно охарактеризованы представители этой мало исследованной группы ферментов CYP 74. В результате проведенной сложной

экспериментальной работы были уточнены данные по ранее известным ферментам и охарактеризованы новые ферменты, один из примеров - представитель нового подсемейства CYP74Q.

Значительная часть работы посвящена изучению вопроса о влиянии отдельных аминокислот на специфичность функций ферментов CYP74. Были выявлены детерминанты, определяющие тип катализа ферментов CYP74, субстрат- и продукт-специфичность ферментов. Автором были созданы мутантные формы фермента, полученные путем изменения основных каталитических сайтов, включая участки «F/L toggle», перегиба I-спирали и ERR-триады, приводящие к изменению свойств ферментов, в том числе ведущие к превращению одной формы фермента в другую: алленоксидсинтаз – в гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы, ферментов с двойной активностью (гидропероксидлиазной и эпоксиалкогольсинтазной – в алленоксидсинтазы, дивинилэфирсинтазы – в алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы. Был выявлен универсальный каталитический механизм, ведущий к образованию продуктов эпоксиалкогольсинтазной, гидропероксидлиазной и алленоксидсинтазной реакций. После вызвавшего большой интерес сообщения о возможности преобразования одного фермента в другой (алленоксидсинтазы в гидропероксидлиазу) путем замены остатка аминокислоты в белке (Lee et al., 2008), цикл работ, выполненных Топорковой Я.Ю. показал, что такое превращение — это не частный случай, а закономерное свойство ферментов CYP74, скорее всего, отражающее биологические функции этих ферментов и их эволюцию. На основании собранной совокупности данных было предположено, что именно «эпоксиалкогольсинтазы являются прототипическими ферментами метаболизма гидроперекисей жирных кислот».

С точки зрения оппонента все экспериментальные задачи выполнены безупречно, химические и биохимические анализы выполнены на самом высоком уровне.

По содержанию работы есть только одно замечание:

- Активность всех ферментов продемонстрирована только *in vitro*. Изменение активности экспрессии исследуемого гена в организме и изучение влияния таких манипуляций на оксипиновый профиль позволили бы получить более полную информацию о биологических функциях ферментов CYP74. Этот комментарий можно рассматривать как пожелание автору диссертации дальнейший научных исследований.

По тексту диссертации есть несколько замечаний технического характера:

- В отношении рисунка 12, показывающего клеточную компартментализацию разных этапов биосинтеза жасмонатов: фермент ОФДК-редуктаза локализован в пероксисомах. Его правильнее было бы показать в этом компартменте.

- Написано: «Выделение GLV стимулируется поранением, нанесенным, например, тлей. Одновременно, однако, эти грызущие насекомые стимулируют выработку жасмоновой кислоты...». Тли имеют колюще-сосущий ротовой аппарат.

- В тексте несколько раз используется словосочетание «несинонимичные аминокислотные остатки», например, стр. 246. Хотя такое словосочетание и встречается в литературе, но оно не верно. Синонимичной или несинонимичной может быть мутация или замена нуклеотидов в гене, а не аминокислота в белке. Правильнее было бы сказать: «несинонимичная замена/ мутация, ведущая к замене аминокислоты в белке».

- На некоторых графиках не хватает информации о статистической значимости наблюдаемых различий, в частности, на графиках, показывающих зависимость каталитической активности рекомбинантных ферментов от значения pH реакционной смеси.

Все указанные недочеты несколько не снижают ценности рассматриваемой диссертационной работы. Диссертационная работа Топорковой Я.Ю. представляет собой совокупность оригинальных исследований,

соответствующих самому современному уровню научных знаний в биологии растений. Основные научные результаты, включенные в диссертационную работу, опубликованы в высокорейтинговых журналах.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах. По теме диссертационной работе автором опубликовано 22 работы в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК (в том числе в авторитетных высокорейтинговых международных журналах *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids; Phytochemistry; FEBS Letters*). В большинстве статей Топоркова Я.Ю. является первым и/или корреспондирующим автором, сделавшим основной вклад в работу. Ключевые результаты работы полностью изложены в опубликованных статьях в рецензируемых журналах. Материалы диссертационной работы прошли обширное обсуждение на международных и всероссийских конференциях, съездах. В целом, статьи и доклады автора в рамках темы диссертационного исследования являются широко известными среди специалистов, занятых изучением структурно-функциональных свойств ферментов липоксигеназного каскада и продуктов их каталитического действия.

Заключение

В представленной диссертационной работе выявлены и охарактеризованы новые ферменты липоксигеназного каскада – эпоксиалкогольсинтазы, а также показано, что другие ферменты могут обладать дополнительной эпоксиалкогольсинтазной активностью. На основании этого считаю, что объем, качество и актуальность выполненных исследований полностью соответствует требованиям, установленным разделом II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 1539 от 11.09.2021 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а также паспорту специальности «1.5.21. – физиология и биохимия растений» по пп.7, 9, 11. На основании вышесказанного Топоркова Яна Юрьевна, несомненно,

заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений.

Ведущий научный сотрудник, и. о. зав. Лабораторией фотосинтетического окисления воды Института фундаментальных проблем биологии РАН, доктор биологических наук (специальность – 03.01.05. (1.5.21.) физиология и биохимия растений) «10» октября 2022 г.



Татьяна Викторовна Савченко

Контактные данные

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук"

Почтовый адрес: 142290, гор. Пушкино, ул. Институтская, д. 2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук.

Телефон: +7 (496)773-37-18.

Адрес электронной почты: savchenko_t@rambler.ru

Подпись Т.В.Савченко заверяю

