

ОТЗЫВ

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

Актуальность и научная новизна

Ферменты являются непревзойденными биокатализаторами и они играют исключительно важную роль в функционировании всех живых систем, начиная от одноклеточных и завершая млекопитающими и растениями. Фермента из растений в последнее время уделяется все большее внимание и они являются первостепенными объектами исследований многих лабораторий мира. Знание типов ферментов, их свойства позволяет построить метаболические пути. Совокупность всей такой информации используется как для получения растений с улучшенными свойствами (например, борьба с засухой, патогенами и т.д.), а также использовать растительные ферменты для получения известных, а также новых препаратов с высокой биологической активностью.

Окислительный метаболизм полиеновых жирных кислот является источником важнейших биорегуляторов – оксипинов, контролирующих гомеостаз на клеточном и организменном уровне у различных живых организмов. Например, у млекопитающих эйкозаноиды, продукты окислительных превращений жирных кислот эйкозанового ряда, контролируют основные физиологические функции: сердечно-сосудистой и респираторной систем, работу органов пищеварения, воспроизводства и т.д. Исключительно важна роль эйкозаноидов в воспалительных процессах, анафилаксии и системах иммунного ответа. Окислительный метаболизм ненасыщенных жирных кислот у растений значительно менее изучен. Кроме того, жирнокислотный состав растений резко отличается от такового млекопитающих. У цветковых растений отсутствуют

арахидоновая и родственные ей кислоты эйкозанового ряда. Преобладающими жирными кислотами являются октадекановые кислоты, альфа-линоленовая и линолевая. Так же как у млекопитающих, у растений широко распространены липоксигеназы, ключевые ферменты липоксигеназного каскада. Вторичные превращения гидроперекисей жирных кислот (продуктов липоксигеназ) у растений контролируются преимущественно ферментами семейства СYP74, неклассическими цитохромами P450. Из ферментов СYP74 наиболее распространены алленоксидсинтазы (АОС) и гидропероксидлиазы (ГПЛ). Гораздо реже встречаются другие представители данного семейства белков – дивинилэфирсинтазы (ДЭС). Новый фермент СYP74, эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС), был обнаружен в ланцетнике *Branchiostoma floridae* в 2008 году и до настоящей работы оставался единственным представителем этой группы ферментов. При этом эпоксиалкогольсинтазы являются, по-видимому, широко распространенными, поскольку 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.

В связи с вышесказанным актуальность и научная новизна работы Топорковой Я. Ю. не вызывает никаких сомнения.

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

Данная работа является частью фундаментальных исследований по изучению окислительного метаболизма полиеновых жирных кислот, проводимых в Казанском институте биохимии и биофизики под руководством академика РАН Гречкина А.Н. Поэтому цели и задачи исследования полностью соответствуют направлению и содержанию вышеуказанных исследований. Они четко сформулированы и обоснованы. Все поставленные цели полностью достигнуты, а

задачи полностью решены. Выводы диссертации полностью обоснованы и вытекают из полученных результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается адекватно выбранными методами и достаточным объемом материала.

Общая характеристика, структура и оформление диссертации

Диссертационная работа Я.Ю. Топорковой построена по традиционному принципу и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 438 страницах машинописного текста, содержит 136 рисунков, 26 таблиц и приложение, приведены ссылки на 623 источников на русском и английском языках. Материалы диссертации апробированы на научных конференциях различного уровня. По результатам представленных данных опубликовано 22 научных статьи в рецензируемых изданиях.

Во **«Введении»** автор обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цели и задачи исследования, представляет научную новизну и практическую значимость работы и формулирует основные положения, выносимые на защиту.

«Обзор литературы». Обзор литературы состоит из 21 подраздела, в которых очень подробно и детально рассматриваются как виды и типы оксипинонов, так и их роль в растениях, Обсуждены различные пути их образования и ферменты, участвующие в этих путях. Приводится характеристика ферментов липоксигеназного каскада в целом и продуктов их каталитического действия. Есть раздел, посвященный практическому применению. Следует отметить высокую тщательность отбора и полноту представленной информации. Рассмотрены самые разнообразные аспекты данной тематики - от физиологии и метаболизма оксипинонов до структуры и каталитических свойств описанных в литературе ферментов, участвующих в вышеуказанных процессах. В целом «Обзор

литературы» позволяет понять и оценить важность и актуальность данной работы и понять цели, план и логику дальнейших исследований.

«Материалы и методы исследования». Используемые методы и подходы, описанные в этом разделе, соответствуют поставленной цели и задачам. В экспериментах применены следующие методы: биоинформационный анализ геномных, транскриптомных и протеомных баз данных, а также компьютерных моделей белков; комплекс современных методов геной и белковой инженерии для манипуляции с ДНК и белками, включая молекулярное клонирование, получение рекомбинантных белков, различные виды хроматографии, сайт-направленный мутагенез; выявление специфичных продуктов реакций (основных и минорных), катализируемых целевыми ферментами, а также новых оксилипинов *in vivo*, методами ГХ-МС, ВЭЖХ и ЯМР; филогенетические исследования. Методы описаны достаточно подробно. Информация, представленная в данном разделе позволяет сделать вывод, что работа выполнена на самом высоком экспериментальном уровне с применением самых последних достижений методов исследования физико-химической биологии.

Глава **«Результаты и обсуждение»** включает 22 подраздела и представлена на 187 страницах. В работе описаны получение и изучение каталитических свойств двадцати семи ферментов, выявление филогенетической близости описанных ферментов, а также изучение взаимосвязи структуры и каталитических свойств полученных ферментов. Особенно хочется отметить широту набора субстратов, систематичность полученных данных, что в дальнейшем несомненно позволит провести корректное сравнение с имеющимися и новыми результатами. Автором получены принципиально новые и неожиданные результаты. Например, автор внес правильное понимание во взаимосвязь структура и функция ряда ферментов - установлено, что ферменты подсемейства СУР74С, ранее описанные как 9/13-специфичные гидропероксидлиазы, являются ферментами с двойной активностью гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы в зависимости от используемого

субстрата. В конце раздела автор рассуждает об эволюции ферментов клана СУР74, а также значении этих ферментов для растений в ходе эволюции.

За разделом «**Результаты и обсуждения**» (Глава 3) следует раздел «**Заключение**», в котором кратко представлено обсуждение проделанной работы. Автором кратко, но полно суммированы все результаты, что сильно облегчает оценку данной работы.

«**Выводы**», Сформулированные Я.Ю. Топорковой выводы работы основаны на результатах многочисленных экспериментов, причем в большинстве случаев автором использованы различные методы и взаимозаменяемые экспериментальные подходы. В целом достоверность результатов работы и обоснованность выводов не вызывают сомнения.

По данной работе нет замечаний научного характера, однако в плане оформления и использования терминов следует отметить следующее:

1. Во всех таблицах, в которых приведены данные по кинетическим параметрам ферментов, а также результатам культивирования представлены значения со слишком высокой точностью – до 5-6 знаков. С учетом того, что при определении значений кинетических параметров ошибка эксперимента составляет в среднем 10%, а воспроизводимость микробиологических экспериментов как правило равна 20-30%, то данные следовало бы приводить максимум с 3 знаками.
2. Автор использует старое название «перекись водорода», хотя согласно номенклатуре IUPAC правильное название «пероксид водорода»
3. Некорректное выражение ««транзитного пептида в нативной последовательности» (стр. 189». Общепринято выражение «сигнальный пептид» вместо «транзитный пептид» и в таком контексте следует говорить о не нативной последовательности, а о последовательности про-фермента.

4. Термин «рекомбинантная плазмида» (стр. 201) также в литературе не встречается, поскольку уже сама исходная плазмида получена по технологии рекомбинантных ДНК. Тем более термин «рекомбинантный» буквально через пару строк используется как «рекомбинантный белок», что действительно общепринято.

Кроме того, в качестве рекомендации (но не замечания) хочу высказать пожелание, чтобы авторы в дальнейшем уделили самое серьезное внимание анализу полученных результатов с точки зрения сравнения третичной и четвертичной структур исследованных ферментов. Хорошо известно, что даже функционально одинаковые белки и ферменты с низкой гомологией (20-30%) по последовательности могут иметь очень высокую структурную гомологию. Поэтому именно анализ 3D-структур может дать очень важную информацию об особенностях (общие черты и различия) в каталитическом механизме сравниваемых ферментов. Например, их предпочтение к положению двойной связи.

Следует отметить, что сделанные замечания относятся к формальным вещам по оформлению и никоим образом не затрагивают надежность полученных результатов и сделанных на их основе выводов.

Работа Я.Ю. Топорковой хорошо оформлена, написана ясным научным языком и хорошо проиллюстрирована. Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены корректно. Содержание автореферата диссертации полностью соответствует содержанию работы. Исследование выполнено на высоком научном экспериментальном и теоретическом уровне. Как уже было отмечено, подавляющее большинство полученных результатов являются абсолютно новыми и потому имеют высокую актуальность, фундаментальную значимость и научную новизну. Диссертационное исследование по своему содержанию соответствует заявленной специальности «1.5.21 – физиология и биохимия растений». С учетом важности проведенных исследований для физиологии и биохимии растений, а также для

медицины и фармацевтики высокая практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнения. Сделанные по работе замечания не носят принципиального характера и не влияют на основные результаты и выводы диссертации.

Основные результаты работы опубликованы в 22-ти статьях в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ, большинство с высоким импакт-фактором. Материалы работы также были представлены на ведущих по профилю диссертации международных и российских конференциях. Количество и качество публикаций отражает высокий уровень проведенных исследований.

Таким образом, анализ диссертационной работы Я.Ю. Топорковой свидетельствует о ее завершенности и разработке в рамках данного исследования ряда теоретических положений, которые в совокупности можно квалифицировать как новое крупное научное достижение. На основании научной новизны, высокой актуальности и теоретического и практического значения полученных результатов считаю, что диссертационная работа «Эпоксидалькогильсинтазы клана CYP74 – новые участники липоксигеназного каскада» полностью удовлетворяет требованиям Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 26 сентября 2022 г. № 1690 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор, Топоркова Яна Юрьевна, заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности «1.5.21 – физиология и биохимия растений».

Официальный оппонент

Тишков Владимир Иванович

профессор кафедры химической энзимологии
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,

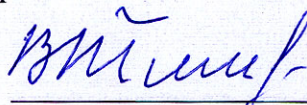
Заслуженный работник РФ с сфере образования,
доктор химических наук

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
02.00.15 – Кинетика и катализ
профессор по специальности 03.00.04 – Биохимия

Адрес: 119991, Москва, Ленинские Горы, д.1, стр. 11Б

Тел: +7 (495) 514-7909

Адрес электронной почты: vitishkov@gmail.com



В.И. Тишков

«10» октября 2022 года

Подпись В.И. Тишкова заверяю:

