

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.225.02,  
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО  
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 03.11.2022 № 23

О присуждении **Топорковой Яне Юрьевне**, гражданину РФ, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация **«Эпоксидалькогильсинтазы клана CYP74 – новые участники липоксигеназного каскада»** по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений принята к защите 23.06.2022 г. (протокол № 17) диссертационным советом 24.1.225.02, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский Научный Центр Российской академии наук» (ФИЦ КазНЦ РАН) Министерства образования и науки Российской Федерации 420111, г. Казань, ул. Лобачевского д. 2/31 (приказ Минобрнауки РФ №788/нк от 09.12.2020 г.).

Соискатель, Топоркова Яна Юрьевна, 08.02.1984 года рождения, в 2006 году окончила Казанский государственный университет по специальности «Генетика». Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук защитила в 2009 году в диссертационном совете 24.1.225.02, созданном на базе Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН). С 2006 г. по настоящее время Топоркова Я.Ю. работает в лаборатории оксипинов Казанского института биохимии и биофизики –

обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН) Министерства науки и высшего образования РФ в должности ведущего научного сотрудника.

Диссертация выполнена в лаборатории оксипиринов КИББ ФИЦ КазНЦ РАН. **Научный консультант** – академик РАН, доктор химических наук **Гречкин Александр Николаевич**, заведующий отделом клеточной сигнализации КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

**Официальные оппоненты:**

**1. Тишков Владимир Иванович** – доктор химических наук, профессор кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

**2. Савченко Татьяна Викторовна** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией фотосинтетического окисления воды Федерального государственного учреждения науки Института фундаментальных проблем биологии Российской Академии наук, г. Пущино.

**3. Иванов Игорь Владимирович** – доктор химических наук, профессор кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова "МИРЭА – Российского технологического университета", г. Москва.

Все оппоненты дали положительные отзывы на диссертационную работу Топорковой Я.Ю.

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук – в своем положительном заключении, подписанном руководителем отдела физико-химических методов исследования, доктором биологических наук Мошковым Игорем Евгеньевичем, указала, что диссертация Топорковой Я.Ю. посвящена изучению вопросов биосинтеза важнейших растительных биорегуляторов –

оксилипинов и является актуальной для фундаментальной и прикладной науки. Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям раздела II «Положения 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.

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. Значительная часть работ относится к Q1. В большинстве работ Топоркова Я.Ю. является первым автором или автором для переписки. Общий объем опубликованных по теме диссертации работ составляет 191 страницу. Работы написаны соискателем в соавторстве с другими исследователями; личный вклад диссертанта заключается в постановке целей исследований, выполнении и оформлении основной части экспериментов и анализе полученных результатов. Диссертационная работа содержит достоверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

#### **Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:**

1. **Топоркова Y. Y.**, Fatykhova, V. S., Gogolev, Y. V., Khairutdinov, B. I., Mukhtarova, L. S., & Grechkin, A. N. Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2017. – Т. 1862. – №. 2. – С. 167-175. (Scopus Q1, WoS Q1).
2. **Топоркова Y. Y.**, Gorina, S. S., Bessolitsyna, E. K., Smirnova, E. O., Fatykhova, V. S., Brühlmann, F., ... & Grechkin, A. N. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed

mutagenesis //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – Т. 1863. – №. 4. – С. 369-378. (Scopus Q1, WoS Q1).

3. **Toporkova Y. Y.**, Smirnova, E. O., Gorina, S. S., Mukhtarova, L. S., & Grechkin, A. N. Detection of the first higher plant epoxyalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spikemoss *Selaginella moellendorffii* //Phytochemistry. – 2018. – Т. 156. – С. 73-82. (Scopus Q1, WoS Q1).

4. **Toporkova Y. Y.**, Askarova, E. K., Gorina, S. S., Ogorodnikova, A. V., Mukhtarova, L. S., & Grechkin, A. N. Epoxyalcohol synthase activity of the CYP74B enzymes of higher plants //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2020. – Т. 1865. – №. 9. – С. 158743. (Scopus Q1, WoS Q1).

5. **Toporkova Y.Y.**, Smirnova, E.O., Iljina, T.M., Mukhtarova, L.S., Gorina, S.S. & Grechkin, A.N. The CYP74B and CYP74D divinyl ether synthases possess a side hydroperoxide lyase and epoxyalcohol synthase activities that are enhanced by the site-directed mutagenesis //Phytochemistry. – 2020. – Т. 179. – С. 112512. (Scopus Q1, WoS Q1).

На диссертацию и автореферат поступило 6 отзывов: от д.б.н., профессора, г.н.с., зав. лабораторией биоинженерии растений ФГБНУ ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» Дейнеко Елены Викторовны; от д.б.н., профессора, г.н.с. Института биологии Коми НЦ УрО РАН обособленного подразделения ФБУН ФИЦ «Коми НЦ УрО РАН» Головки Тамары Константиновны; от д.б.н., профессора, зав. кафедрой физиологии и биохимии растений биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета Медведева Сергея Семеновича; д.б.н., руководителя группы функциональной геномики ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН» Голденковой-Павловой Ирины Васильевны; д.б.н., в.н.с. лаборатории сравнительной биохимии ФГБУН "Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского" Дальневосточного отделения РАН Светашева Василия

Ивановича; д.б.н., доцента, в.н.с. лаборатории химии ферментов, зам. директора по научной работе ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН Кусайкина Михаила Игоревича. Все отзывы положительные.

Топоркова Я.Ю. ответила на замечание об отсутствии подробных физико-химических характеристик рекомбинантных ферментов и количественного анализа продуктов реакции. С высказанными замечания по стилистике некоторых формулировок и наличию опечаток в тексте автореферата автор работы согласилась.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области энзимологии, биохимии и физиологии растений и имеют научные работы, опубликованные в центральных российских и зарубежных изданиях, относящихся к тематике защищаемой диссертации. Ведущая организация является признанным научным центром РФ, занимающимся фундаментальными проблемами физиологии и биохимии растений.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

диссертантом обнаружен и изучен новый тип ферментов липоксигеназного сигнального каскада – эпоксиалкогольсинтазы, ответственные за образование эпокиспиртов у растений и представителей других таксонов. Кроме того, в диссертационной работе показано, что ряд ферментов СУР74, описанных ранее как алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы или дивинилэфирсинтазы, помимо основной каталитической активности, проявляют дополнительно эпоксиалкогольсинтазные свойства. Этот факт объясняет отсутствие специализированных эпоксиалкогольсинтаз у растений, у которых выявлены эпокиспирты – продукты эпоксиалкогольсинтазной ветви липоксигеназного каскада. При этом наличие двух активностей у одного фермента (как

правило, гидропероксидлиазной и эпоксиалкогольсинтазной) позволяет растению вырабатывать более широкий спектр защитных соединений, в том числе заживляющих раны, сигнализирующих об опасности и проявляющих бактерицидный или фунгицидные свойства.

В ходе выполнения работы расшифрован механизм каталитического действия эпоксиалкогольсинтаз. Кроме того, в работе были расшифрованы структуры ряда оксипиринов, в том числе дивиниловых эфиров и эпоксиспиртов, синтезируемых при участии ферментов CYP74. Показано, что эпоксиспирты, синтезируемые при участии ферментов растений и бурых водорослей, отличаются по структуре от продуктов каталитического действия ферментов животных. В экспериментах с использованием  $^{18}\text{O}$  показано, что эпоксиалкогольсинтазы представляют собой изомеразы; они включают в продукт оба атома кислорода из субстратов, меченных  $^{18}\text{O}_2$ .

С помощью сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы ферментов семейства CYP74 и проведены следующие превращения ферментов: алленоксидсинтаз – в гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы; ферментов с двойной активностью гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы – в алленоксидсинтазы; дивинилэфирсинтаз – в алленоксидсинтазы, а также в ферменты с двойной активностью гидропероксидлиазы/эпоксиалкогольсинтазы.

#### **Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

Обнаружены и описаны эпоксиалкогольсинтазы – новые ферменты липоксигеназного каскада у растений, а также у организмов, принадлежащих другим таксонам. Показано, что некоторые ферменты CYP74 проявляют двойную активность гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы в зависимости от используемого субстрата. Дополнительную эпоксиалкогольсинтазную активность проявляет ряд цитохромов P450 клана CYP74, описанных или аннотированных ранее как алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы и дивинилэфирсинтазы. Для ряда ферментов CYP74 доказана взаимосвязь первичной структуры каталитически важных доменов

и типа каталитической активности с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Расшифрованы механизмы каталитического действия эпоксиалкогольсинтаз и ферментов, проявляющих дополнительную эпоксиалкогольсинтазную активность наряду с алленоксидсинтазной, гидропероксидлиазной и дивинилэфирсинтазной. Выявлены общие закономерности каталитического действия эпоксиалкогольсинтаз, их первичной структуры, а также структуры продуктов, синтезируемых при участии этих ферментов. Сформулировано предположение о возможном значении ферментов с двойной и тройной активностями для растений: широкий спектр синтезируемых оксипинов (сигнальных и защитных) при участии одного фермента дает преимущества растению при формировании ответа на стрессовые факторы. 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: по-видимому, эпоксиалкогольсинтазная реакция является базовой, а остальные реакции по очереди «надстраивались» в процессе видоизменения этой базовой реакции в результате дополнительного влияния боковых групп новых аминокислот, появляющихся в ходе эволюции в результате точечных мутаций.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

цитохромы P450 катализируют окислительно-восстановительные реакции экзогенных соединений, в том числе ксенобиотиков, лекарств, загрязняющих агентов из окружающей среды, химических канцерогенов. Некоторые оксипины проявляют противораковую, антибактериальную, противогрибковую и противопаразитарную активность. Разработанные системы получения и препаративной очистки цитохромов растений могут представлять интерес для промышленности. Исследования масличных,

зерновых и технических культур, а также лекарственных растений являются актуальными с точки зрения экономики. Результаты экспериментов по сайт-направленному мутагенезу представляют интерес для практического использования в биоинженерии: полученные результаты работы могут быть использованы для создания сортов растений, удовлетворяющих требованиям современного сельскохозяйственного производства, методом геномного редактирования. Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в учреждениях медицинского, сельскохозяйственного, биологического и биотехнологического профилей, занимающихся получением рекомбинантных ферментов, исследованием взаимосвязи структуры и функций белков, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по биохимии, физиологии растений и молекулярной биологии в вузах.

#### **Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

В работе использованы классические и современные методы и подходы физиологии растений, биохимии, биофизики и молекулярной биологии. Результаты получены на двадцати шести рекомбинантных белках. Сходные каталитические свойства показаны на многих гомологичных белках. Полученные результаты являются новыми и имеют высокую актуальность, фундаментальную значимость и научную новизну. Выводы обоснованы и соответствуют задачам.

**Личный вклад соискателя состоит в:** непосредственном его участии в составлении плана исследования. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора и данных, полученных при его непосредственном участии. Эксперименты по исследованию структуры продуктов каталитического действия ферментов СУР74 методом ЯМР проводили совместно со старшим научным сотрудником лаборатории биофизической химии наносистем к.б.н. Б.И. Хайрутдиновым (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН). Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и научным



консультантом. Материалы прошли апробацию на многочисленных всероссийских и международных конференциях и симпозиумах.

В ходе защиты диссертации критических замечаний не было, при обсуждении возникли следующие вопросы:

1. Где локализованы ферменты СУР74?
2. Какой параметр лежит в основе предложенной классификации ферментов СУР74?
3. Чем отличаются ферменты СУР74 у эволюционно древних и современных растений?
4. На чем основана логика выбора объектов исследования?
5. Проявляется ли двойная активность ферментов СУР74 *in vivo*?
6. Как регулируется активность ферментов СУР74?
7. Какой механизм антиоксидантной активности ферментов СУР74?
8. Существует ли возможность предсказывать тип каталитической активности по аминокислотной последовательности ферментов СУР74?
9. Каким методом определяли структуру отдельных изомеров оксипинолов?

Соискатель Топоркова Я.Ю. ответила на заданные в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию. 13-Специфичные ферменты, как правило, локализованы в разных мембранах хлоропластов. 9/13-Специфичные ферменты локализованы в цитоплазме. Ранее считалось, что 9/13-специфичные ферменты локализуются в незеленых органах, тогда как 13-специфичные ферменты – в зеленых. Однако более тщательный анализ показал, что в различных органах синтезируются ферменты обоих типов.

Ранее считалось, что к разным подсемействам СУР74 относятся ферменты с разной каталитической активностью. В настоящее время очевидно, что к разным подсемействам, которые выделяются строго на основании требований номенклатуры, относятся ферменты с разной каталитической активностью. Гораздо более строгим критерием на данный

момент является субстратная специфичность; к одному подсемейству относятся ферменты с одинаковой субстратной специфичностью.

До недавнего времени считалось, что дивинилэфирсинтазы, как наиболее молодая группа ферментов CYP74, являются одними из последних приобретений; этим объяснялось их отсутствие у эволюционно древних растений. Однако у плаунка *Selaginella moellendorffii* были обнаружены две высокоспецифичные дивинилэфирсинтазы. По-видимому, все разнообразие ферментов CYP74 появилось до разделения различных эволюционных ветвей растений.

Логика выбора объектов заключалась в том, чтобы проверить наличие эпоксиалкогольсинтазной активности у максимально разнообразных представителей ферментов CYP74: рассматривали ферменты, проявляющие разные типы каталитической активности и субстратной специфичности, а также ферменты, относящиеся к разным подсемействам согласно классической номенклатуре.

Антиоксидантную активность проявляли ферменты CYP74 в период накопления молекулярного кислорода в атмосфере. Впоследствии произошло переключение с функции, связанной с превращением субстрата, на функцию, связанную с биосинтезом продукта. Если раньше гидроперекиси образовывались под воздействием активных форм кислорода и ферменты CYP74 были необходимы для их нейтрализации, то в настоящее время гидроперекиси синтезируются липоксигеназами в качестве субстратов для ферментов CYP74 в рамках липоксигеназного каскада.

В ходе экспериментов по изучению изменений в функционировании липоксигеназного каскада у табака при инфицировании фитопатогеном *Pectobacterium atrosepticum*, проведенных совместно с лабораторией инфекционных заболеваний растений, было показано, что в результате инфицирования синтезируются гидропероксидлиазные и эпоксиалкогольсинтазные продукты. Однако практически все ферменты CYP74 ранее были аннотированы как дивинилэфирсинтазы. Нами была

проведена реаннотация этих ферментов по последовательностям каталитически важных доменов, выбран фермент, экспрессия гена которого повышается при инфицировании; клонирована его открытая рамка считывания, получен рекомбинантный фермент, и показано, что он проявляет гидропероксидазную и эпоксиалкогольсинтазную активности.

Регуляторные элементы в последовательностях ферментов СУР74 отсутствуют. Активность фермента регулируется доступностью субстрата.

Структуры отдельных изомеров оксипинов определяли методом ЯМР, сопоставляя полученные данные с данными литературы.

На заседании 03 ноября 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Топорковой Яне Юрьевне ученую степень доктора биологических наук за выявление и характеристику новых ферментов – эпоксиалкогольсинтаз и ферментов, проявляющих эпоксиалкогольсинтазную активность наряду с другими каталитическими активностями, и получение оригинальных данных о путях биосинтеза ряда оксипинов в рамках липоксигеназного каскада, что расширяет знания о функционировании липоксигеназного каскада в целом и его становлении в ходе эволюции.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 8 докторов наук по научной специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений (биологические науки), участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за – 16, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Заместитель председателя диссертационного  
совета, д.х.н., профессор

Зуев Юрий Федорович

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.б.н.

Пономарева Анастасия Анатольевна



03.11.2022 г.