

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Фатыховой Валерии Сергеевны «Структурно-функциональные свойства эпоксиалкогольсинтазы CYP5164B1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - «физиология и биохимия растений».

Диссертационная работа Фатыховой В. С. посвящена идентификации фермента пути биосинтеза оксилипинов, эпоксиалкогольсинтазы, в бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и изучению каталитических свойств этого фермента. Исследование охватывает широкий круг вопросов, связанных с механизмами каталитических превращений гидроперекисей жирных кислот, осуществляемых ферментами CYP74, полученные результаты позволяют сделать обоснованные выводы в отношении эволюции семейства CYP74 и клана CYP74, а в конечном счете, самого пути биосинтеза оксилипинов. В этой связи диссертационная работа В.С. Фатыховой, безусловно, является актуальной.

Диссертационная работа построена в классическом стиле и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 169 страницах, включает 44 рисунка и 7 таблиц, список цитированной литературы содержит 246 ссылок на статьи и сайты интернета с базами данных и программами для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Введение диссертации содержит обоснование актуальности работы, здесь указаны цель и задачи исследования, отмечены научная новизна и практическая значимость работы. Обзор литературы описывает современное состояние исследований в области липоксигеназного пути превращения ненасыщенных жирных кислот, дает подробную характеристику ферментов CYP74, вовлеченных в биосинтез оксилипинов, включает сведения об оксилипинах бурых водорослей и знакомит с объектом исследования – бурой водорослью *Ectocarpus siliculosus*. Обзор литературы полный и интересный, содержит понятно изложенный материал по исследуемому предмету и оставляет очень хорошее впечатление.

Раздел «Объекты и методы исследования» написан достаточно подробно. Экспериментальная работа включает широкий спектр современных методов и подходов,

включая методы биоинформатики, молекулярно-биологические и биохимические методы, методы спектрального анализа. Все используемые методы исследования изложены ясно и достаточно подробно для их воспроизведения.

Экспериментальная часть работы представлена девятью подглавами, которые логически связаны друг с другом и последовательно описывают решение поставленных задач. В недавно расшифрованном и частично аннотированном геноме бурой водоросли *E. siliculosus* автором обнаружена открытая рамка считывания, кодирующая белок, обладающий сходством с алленоксидсинтазой кукурузы, ферментом пути биосинтеза оксилипинов. Анализ консервативных доменов кодируемого белка позволил выявить родство клану CYP74 и семейству CYP74. Анализ активности рекомбинантного белка, экспрессированного в *E. coli*, позволил идентифицировать новый фермент как эпоксиалкогольсинтазу (EsEAS), выявить субстрат-специфичность фермента, а также идентифицировать продукты реакции. Привлечение нескольких методов, таких как газовая хромато-масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография (радио-ВЭЖХ) и ядерный магнитный резонанс (ЯМР), для анализа и идентификации продуктов ферментативной реакции позволило установить химическую природу продуктов, определить трехмерную ориентацию атомов молекул в пространстве. Полученные результаты не оставляют сомнений в том, что исследуемый фермент является эпоксиалкогольсинтазой. Используя в экспериментальной работе меченные изотопом ^{18}O субстраты, автор раскрывает механизм каталитического действия EsEAS. Анализ полученных результатов позволяет сделать обоснованные предположения об общих механизмах действия ферментов семейства CYP74, и, так называемых, «точках переключения» в механизме катализа ферментов CYP74, алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы, дивинилэфирсинтазы и эпоксиалкогольсинтазы. Автор приводит убедительные данные в пользу того, что превращение гидроперекисей происходит посредством гомолиза гидроперекисной группы, и эпоксиаллильный радикал является промежуточным продуктом всех ферментов клана CYP74. Предлагается модель превращения эпоксиаллильного радикала при участии разных типов ферментов CYP74.

В результате сравнения EsEAS с ферментами, обладающими сходной субстратной специфичностью, алленоксидсинтазой томата LeAOS3 и дивинилэфирсинтазой табака NtDES, дикими типами и их мутантными формами с точечными заменами аминокислот, Фатыховой В. С. удалось выявить аминокислотные замены, приводящие к снижению каталитической активности ферментов, или даже к изменению механизма

каталитического действия. Здесь затронут интересный аспект современных исследований – продукт-специфичность ферментов семейства CYP74 и возможность взаимопревращений этих ферментов в результате замен единичных аминокислот. Следует отметить большой объем работы по сайт-направленному мутагенезу, экспрессии белков и анализу ферментативной активности, проведенной Фатыховой В.С.

Очень интересны результаты анализа оксилипинового профиля бурых водорослей, собранных на побережье Японского моря. Анализ жирнокислотного/оксилипинового профиля исследуемых бурых водорослей подтвердил наличие эпоксиалкогольсинтазной активности у исследуемых организмов. Таким образом, в работе затрагивается очень интересный и актуальный вопрос о функционировании липоксигеназного каскада у морских организмов.

Глава «Результаты и их обсуждение» хорошо иллюстрирована, что способствует полному пониманию текста.

Завершают диссертацию девять выводов, в которых отражены основные результаты исследования и их значимость. Выводы основаны на результатах большого числа проведенных экспериментов, сформулированы конкретно и ясно, и вполне согласуются с задачами, поставленными в диссертационной работе.

После внимательного ознакомления с диссертационной работой существенных недостатков не было выявлено, хотя у оппонента возникло несколько вопросов и замечаний:

1. Для получения очищенного препарата рекомбинантного фермента CYP5164B1 *E. siliculosus* последовательность гена для клонирования в вектор pET-23a была искусственно синтезирована. Следовало бы включить в текст диссертации объяснение причины, по которой искусственный синтез оказался предпочтительнее реакции обратной транскрипции с использованием в качестве матрицы РНК, выделенную из тканей исследуемой водоросли.
2. На некоторых рисунках (рис. 22 и 35) хотелось бы видеть «негативный контроль» – результат ПЦР, проведенной с использованием ДНК из клеток *E. coli*, трансформированных вектором, не содержащем последовательности, кодирующие ферменты (CYP5164B1 и NtDES, соответственно).
3. При построении филогенетического дерева ферментов CYP74 на рисунке 20 указаны две гидропероксидлиазы риса (OsHPL1 и OsHPL2), и не включена гидропероксидлиаза OsHPL3, также не понятно, какая из трех гидропероксидлиаз риса представлена на рисунке 5.

4. При описании условий синтеза рекомбинантных белков в клетках *E. coli* (страницы 67 и 90) отмечается, что "выращивание культуры при 42 °С приводит к накоплению в клетках шаперонов и шапероно-подобных белков, которые впоследствии улучшают фолдинг целевого белка." Возникают сомнения в правильности такого утверждения для случаев, когда клетки *E. coli* не были специально генетически модифицированы для синтеза шаперонов и шапероно-подобных белков. В связи с тем, что существуют противоречивые мнения по поводу использования повышенных или пониженных температур для увеличения выхода растворимого белка при синтезе рекомбинантных белков в *E. coli*, хотелось бы видеть данные или ссылки на источники информации, подтверждающие целесообразность выбора указанных экспериментальных условий.
5. Анализ профиля оксипинов *E. siliculosus* в разных условиях выращивания и после воздействия стрессовых факторов, возможно, помог бы пролить свет на вопрос о физиологической роли эпоксиалкогольсинтазной ветви пути биосинтеза оксипинов у морских организмов.
6. В работе встречаются описки:
Стр. 31 – «во внутренних мембранах мезофилла хлоропластов томата» - нужно «хлоропластов мезофилла» вместо «мезофилла хлоропластов»;
Стр. 71 – «Инкубации проводили в течение 20 мин и непрерывном кислородном барботаже». Пропущен предлог «при» перед словом «непрерывном»;

Отмеченные замечания не снижают очевидную научную ценность рецензируемой диссертационной работы. Фатыховой В. С. проделана большая экспериментальная работа, получены новые интересные данные, проведен детальный анализ и сопоставление полученных данных с имеющейся в литературе информацией. Полученные данные вносят существенный вклад в область исследований, связанных с биосинтезом оксипинов, обогащают наше понимание механизмов каталитических превращений гидроперекисей жирных кислот, расширяют представления об эволюции ферментов СУР74. Представленная диссертационная работа – завершённое исследование, соответствующее современному уровню научных знаний в биологии растений. Достоверность полученных результатов и выводы диссертации не вызывают сомнений, их изложение и интерпретация заслуживают самой высокой оценки.

Диссертация написана грамотно и понятно. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные научные результаты, включенные в

диссертационную работу, опубликованы в рецензируемых журналах и доложены на научных съездах и конференциях.

По объему, актуальности, новизне и научной значимости полученных результатов диссертационная работа В.С. Фатыховой «Структурно-функциональные свойства эпоксиалкоголь-синтазы CYP5164B1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*» полностью соответствует всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Фатыхова Валерия Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, доцент,
И. о. ведущего научного сотрудника Лаборатории
фотосинтетического окисления воды,
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института фундаментальных
проблем биологии
Российской академии наук



Т. В. Савченко

1 марта 2017 г.

Контактные данные официального оппонента

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

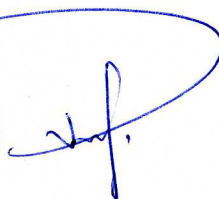
Телефон: +7 (496)773-37-18.

Адрес электронной почты: savchenko_t@rambler.ru

Подпись Савченко Т. В. заверяю

Ученый секретарь ИФПБ РАН

к. ф.-м. н.

Н. Д. Гудков