



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

28.12.2020 № 4.10-48-1856

на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО Директора

Федерального государственного

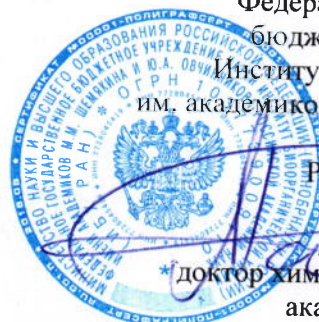
бюджетного учреждения науки

Института биорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова

Российской академии наук



доктор химических наук, профессор,
академик РАН А.Г. Габиров

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Смирновой Елены Олеговны на тему «Структурно-функциональные свойства ферментов подсемейства СYP74M плаунка *Selaginella moellendorffii*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 - Физиология и биохимия растений

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Смирновой Елены Олеговны посвящена исследованию одного из подсемейств ферментов из очень обширного семейства цитохромов P450, в большом разнообразии представленных у растений и животных. Внимание автора сосредоточено на белках СYP74M, которые входят в клан ферментов СYP74. Белки этого семейства катализируют реакции превращения исходных гидропероксидов жирных кислот в разнообразные продукты, обладающие биологической активностью. Отнесение нового белка, обнаруженного в растениях к тому или иному семейству, осуществляется на основании сходства структуры гена этого белка и типа продуктов, которые образуются в результате ферментативной реакции. Но окончательная характеристика ферменту может быть сделана только после его клонирования и тщательного изучения ферментативной реакции. Отсутствие таких данных для белков подсемейства СYP74M у плаунка *Selaginella moellendorffii* – одним из древнейших сосудистых растений, существующих в настоящее время, – побудили автора

предпринять исследования с целью получения и характеристики структурно-функциональных свойств цитохромов P450 подсемейства CYP74M у этого растения. Актуальность данного исследования объясняется несколькими обстоятельствами. Во-первых, характеристика ферментов CYP74 у самых древних наземных растений – мхов и плаунов – позволит приблизиться к решению вопроса о происхождении соответствующих генов у покрытосеменных растений. Во-вторых, до сих пор не было описано ни одной растительной эпоксиалкогольсинтазы как индивидуального белка. Эти ферменты синтезируют очень важные липидные биорегуляторы, родственные высокоактивным гепоксилинам млекопитающих. В-третьих, до сих пор нет ясности в происхождении системы липоксигеназного окисления жирных кислот в комплексе с ферментами, использующими продукты липоксигеназного окисления для дальнейших модификаций молекулы жирных кислот. Таким образом, актуальность темы диссертационной работы Смирновой Е.О. не вызывает сомнений.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Смирновой Е.О. содержит все основные структурные элементы, характерные для диссертации, а именно: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты и обсуждение (последние три раздела объединены в главы 1 – 3), Заключение, Выводы и Список использованной литературы. Кроме того, имеется обширный список использованных сокращений. Материалы диссертации изложены на 158 страницах, содержат 245 ссылок на источники литературы, включая 4 ссылки на Интернет-ресурсы. Текст иллюстрируют 33 рисунка. Количественные данные суммированы в 9 таблицах. Во введении кратко описывается состояние проблемы, актуальность тематики, формулируются цели и задачи исследования, отмечается научная новизна и практическая значимость результатов, перечисляются положения, выносимые на защиту, а также приводятся сведения об апробации работы на отечественных и международных научных мероприятиях. Обзор литературы состоит из восьми подразделов. Вначале даётся общее представление о системе липоксигеназного окисления и продуктов оксипинового каскада. Основное внимание в обзоре уделено ферментам суперсемейства цитохром P450 и, в частности, семейству белков CYP74, подсемейство M которого является предметом диссертационной работы. Чтобы адекватно включить в семейство CYP74 все ферменты, характерные для этой ветви оксипинового каскада, семейство было расширено до клана, и в обзоре приведены характеристики всех четырех типов ферментов этого клана. Автором отмечены особенности структуры белков CYP74, рассмотрены локализация липоксигеназных ферментов, физиологическая роль оксипинов. Е.О. Смирнова также включила в обзор сведения об объекте исследования – плаунке *Selaginella moellendorffii*. Обзор завершается небольшим разделом, конкретизирующим цели и задачи исследования на основании массива рассмотренных известных научных результатов в выбранной области.

В главе 2 приведены методы исследования, использованные в работе. Исследование Е.О. Смирновой носит комплексный характер, поэтому данная глава достаточно обширна по охвату методов биоинформатики, молекулярной биологии, микробиологии и аналитических методик. Методы адекватны поставленным задачам и описаны достаточно полно. Используются современные подходы и методики, что позволило Е.О. Смирновой решить все задачи и достичь цели исследования.

Всё это свидетельствует о хорошей методической подготовке автора.

Глава 3 посвящена описанию результатов проведённого исследования и содержит 6 подразделов, в соответствии с задачами работы. Биоинформационный анализ ферментов CYP74 плаунка *Selaginella moellendorffii* (подраздел 3.1) позволил автору выявить целевые гены и спланировать получение рекомбинантных белков CYP74M1, CYP74M2 и CYP74M3. Выделение их в чистом виде (подраздел 3.2) сделало возможным исследование субстратной специфичности и определение кинетических параметров катализируемых ими реакций (подраздел 3.3). Также описаны результаты идентификации продуктов каталитического действия ферментов (подраздел 3.4 и 3.5) и изучения биологической активности продуктов каталитического действия двух из трёх полученных ферментов (подраздел 3.6). Это наиболее объёмный раздел диссертации (40 стр.), что отражает многоплановость работы.

Оценка оформления диссертационной работы

Диссертационная работа О.Е. Смирновой написана хорошим русским языком с использованием принятой в данной области науки терминологии. Для удобства оценки результатов числовые данные сгруппированы в таблицы. Работа хорошо иллюстрирована, что значительно облегчает чтение. Практически отсутствуют опечатки. Наиболее важные рисунки и таблицы дублированы в автореферате.

Степень новизны результатов научных исследований

Новизна результатов, полученных Е.О. Смирновой, не вызывает сомнений. Ей впервые удалось клонировать гены и охарактеризовать соответствующие рекомбинантные ферменты подсемейства CYP74M плаунка *S. Moellendorffii*, а именно: ферменты CYP74M1, CYP74M2 и CYP74M3. Изучение продуктов катализируемых ими реакций также впервые позволило установить, что белки CYP74M1 и CYP74M3 являются 13-специфичными дивинилэфирсинтазами, которым автор присвоила наименование SmDES1 и SmDES2, соответственно, тогда как фермент CYP74M2 оказался 13-специфичной эпоксиалкогольсинтазой, получившим наименование SmEAS. Это первые охарактеризованные дивинилэфирсинтазы и эпоксиалкогольсинтаза у споровых растений. При этом SmDES1 катализирует образование преимущественно (11Z)-этероле(но)вой кислоты. Впервые охарактеризован биосинтез этих кислот. Впервые продемонстрировано бактерицидное действие (ω 5Z)-этероленовой кислоты и бактериостатическое действие (11Z)-этероленовой и этероленовой кислот в отношении фитопатогенных штаммов бактерий *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043, *Xanthomonas campestris ssp. vesicatoria* и *Pseudomonas syringae ssp. Tomato* и обнаружено существенное влияние геометрии одной двойной связи на биологические свойства дивиниловых эфиров.

Научная и практическая значимость результатов

Работа О.Е. Смирной имеет как фундаментальное, так и практическое значение. С точки зрения фундаментальной науки важный результат – получение в чистом виде ферментов подсемейства CYP74M, характеристика их ферментативной активности и отнесение их к

дивинилэфирсинтазам (CYP74M1, CYP74M3) и эпоксиалкогольсинтазам (CYP74M2). Это создало основу для лучшего понимания происхождения ферментов CYP74 у растений и углубления знаний о механизмах регуляции метаболических процессов в растениях в процессе роста и развития, а также в процессе взаимодействия со средой обитания.

С практической точки зрения важно, что в работе Е.О. Смирновой заложены основы биотехнологии растительных цитохромов P450, которые в соединении с липоксигеназами могут обеспечить эффективное производство новых природных средств защиты растений, а возможно, и биологически активных регуляторов физиологических процессов в организме млекопитающих. О таких возможностях свидетельствуют обнаруженные бактерицидные и бактериостатические свойства нескольких дивиниловых эфиров: этеролоеновой, (11Z)-этеролоеновой и (ω5Z)-этеролоеновой кислот.

Обоснованность заключительных выводов и рекомендации

Для достижения заявленных целей Е.О. Смирновой выбраны адекватные методы исследования с использованием самых современных методик получения и обработки результатов. Поэтому надёжность полученных результатов не вызывает сомнений. Выводы автора полностью соответствуют результатам экспериментов, непротиворечивы и обоснованы.

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 высших учебных заведениях и при подготовке аспирантов.

Полнота опубликования положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований, изложенные в диссертации Е.О. Смирновой, опубликованы в 3 статьях в рецензируемых журналах (2 – в зарубежных изданиях с высоким рейтингом), входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК, и в базы данных Web of Science и Scopus. Также результаты диссертации были представлены на отечественных и международных конференциях и опубликованы в 14 материалах этих мероприятий. Рукопись автореферата соответствует содержанию диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Замечания и комментарии к диссертационной работе

1. В разделе Введения «Постановка проблемы и её актуальность» следовало более определенно сформулировать основную проблему, на решение которой направлено исследование диссертанта.
2. При характеристике полученных автором рекомбинантных белков приведены только данные электрофоретического разделения, но отсутствуют числовые значения чистоты полученных препаратов. Также не были приведены (или не получены) данные, характеризующие

правильность фолдинга этих белков (например, данные измерения кругового дихроизма), и данные сиквенса концевых участков, что подтвердило бы их индивидуальность.

3. Известно, что ферменты семейства СУР74 являются мембраносвязанными ферментами, а полученные автором рекомбинантные белки были растворимыми. Из текста диссертации осталось невыясненным, насколько такие белки соответствуют нативным формам по своей ферментативной активности.
4. Употребляемое автором название радикала «винилоксикарбинильный» (например, на рис.6 и далее в тексте) является неудачным и рекомендуется к использования правилами номенклатуры органических соединений ИЮПАК.
5. Также неудачным является употребление автором при описании спектров ЯМР слов «сдвиг вверх» и «сдвиг вниз» вместо «сдвиг влево» или «сдвиг вправо», поскольку обычно значения химических сдвигов располагаются по горизонтальной оси.
6. На рис. 25 диссертации и рис. 5 автореферата при указании продуктов реакции образования соединений 3(4) пропущена молекула H₂O.

Высказанные замечания не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной к защите работы, выполненной на высоком научном и методическом уровне.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Результаты представленной к защите диссертации свидетельствуют о знании Е.О. Смирновой литературы и проблематики по теме диссертации, владении различными методами физиологии и биохимии растений, молекулярной биологии, биотехнологии и биоинформатики, и умении анализировать и обобщать полученные экспериментальные данные. Исследование выполнено в соответствии с поставленными задачами, а результаты изложены в последовательности, отражающей логику реализации конечной цели всей работы, – получить и охарактеризовать структурно-функциональные свойства цитохромов P450 подсемейства СУР74М плаунка *Selaginella moellendorffii*. Указанное свидетельствует о соответствии соискателя – Елены Олеговны Смирновой ученой степени, на которую она претендует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Смирновой Елены Олеговны на тему «Структурно-функциональные свойства ферментов подсемейства СУР74М плаунка *Selaginella moellendorffii*» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей важное научно-фундаментальное и научно-практическое значение для решения вопросов в области физиологии и биохимии растений. По актуальности темы, научно-методическому уровню, полученным результатам, их теоретической и практической значимости диссертационная работа соответствует пункту 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24

сентября 2013 г. № 842, с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук». Считаю, что автор Смирнова Елена Олеговна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений.

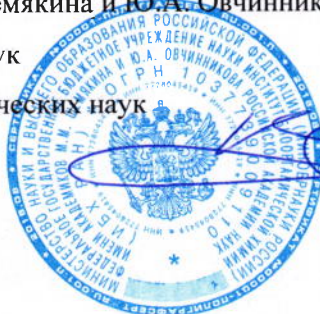
Отзыв ведущей организации составлен на основании заключения расширенного заседания семинара Отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, на котором были обсуждены результаты работы Смирновой Елены Олеговны и одобрены диссертация и автореферат (Протокол № 20201224 от «24» декабря 2020 г.).

доктор химических наук, профессор,
руководитель лаборатории оксипептидов
Отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации,
главный научный сотрудник Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
Телефон +7(495)330-65-92
e-mail: vvbez@ibch.ru

Безуглов Владимир Виленович

28.12.2020 г.

Подпись Безуглова Владимира Виленовича заверяю
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
доктор физико-математических наук
«28» декабря 2020 г.



В.А. Олейников