

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**  
**доктора биологических наук Савченко Татьяны Викторовны**

на диссертационную работу Смирновой Елены Олеговны «Структурно-функциональные свойства ферментов подсемейства CYP74M плаунка *Selaginella moellendorffii*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

В диссертационной работе Смирновой Елены Олеговны были исследованы ферменты пути биосинтеза окислипинов, относящиеся к семейству CYP74, у древнейшего сосудистого растения плаунка *Selaginella moellendorffii*. В недавно секвенированном геноме исследуемого организма было выявлено редкое разнообразие генов, кодирующих ферменты семейства CYP74, при этом ни один из генов не был ранее клонирован, и соответствующие ферменты не были охарактеризованы. Три гена подсемейства CYP74M были клонированы автором данной диссертационной работы, и соответствующие рекомбинантные ферменты были охарактеризованы. По результатам биохимических анализов два фермента были идентифицированы как 13-специфичные дивинилэфирсинтазы и один - как 13-специфичная эпоксиалкогольсинтаза. Используя в качестве субстратов приготовленные в лаборатории гидроперекиси жирных кислот, были получены данные о субстрат-специфичности исследуемых ферментов, идентифицированы продукты ферментативных реакций, определены кинетические параметры реакций, катализируемых рекомбинантными ферментами. Также, Смирновой Еленой Олеговной была проведена работа по исследованию биологической активности продуктов дивинилэфирсинтаз, которая подтвердила антимикробные свойства этих метаболитов.

Диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 158 страницах, включает 33 рисунка и 9 таблиц, список цитированной литературы содержит 245 ссылок на статьи и источники в интернете.

Обзор литературы включает современные данные о растительных окислипинах, путях образования этих метаболитов в растительной клетке и их разнообразных функциях. В обзоре приведена подробная характеристика суперсемейства цитохромов P450 и клана CYP74 этого суперсемейства белков, представлено описание исследуемого объекта. Обзор литературы полный, очень интересный.

Очень хорошо написан также раздел «Объекты и методы исследования», все методы изложены подробно. Для решения поставленных задач были использованы методы биоинформатики, молекулярной биологии, биохимии, химического анализа и

микробиологии. Использование всех методов и подходов научно обосновано, экспериментальная работа продумана до мельчайших подробностей. Многочисленные примеры подтверждают внимание исследователя к деталям. Так, например, при экспрессии рекомбинантных гем-содержащих белков СУР74М в *E. coli* в среду «вносили предшественник гема – 5-аминолевулиновую кислоту», что в сочетании с применением современных векторных систем и специализированных штаммов бактерий позволило получить препараты функционально активных рекомбинантных ферментов.

Глава «Результаты и Обсуждение» представлена несколькими подглавами, которые последовательно описывают исследовательский процесс: идентификацию генов, кодирующих ферменты подсемейства СУР 74М в геноме *S. moellendorffii*, клонирование открытых рамок считывания трех генов СУР74М, экспрессию в *E. coli* и очистку рекомбинантных белков, приготовление субстратов, анализ ферментативной активности, идентификацию продуктов ферментативных реакций, и, наконец, анализ биологической активности некоторых продуктов. Научная новизна и оригинальность представленной работы несомненна. В работе идентифицированы ранее не описанные ферменты пути биосинтеза оксипинов в интересном объекте, занимающем на филогенетическом древе положение между мхами и высокоорганизованными представителями растительного мира. Анализ продуктов ферментативной реакции позволил идентифицировать ферменты СУР74М1 и СУР74М3 как дивинилэфирсинтазы, а СУР74М2 как эпоксиалкогольсинтазу. При этом соотношение продуктов реакций, катализируемых ферментами СУР74М1 и СУР74М3, отличается от соотношения продуктов реакций других 13-специфичных дивинилэфирсинтаз. Фермент СУР74М1 оказался первой дивинилэфирсинтазой, которая катализирует превращение 13-гидроперекисей линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот в (11Z)-изомеры этеролевой и этероленовой кислот, соответственно. Также, в работе был выяснен механизм каталитического действия эпоксиалкогольсинтазы (СУР74М2), расшифрованы структуры образованных продуктов, в том числе одного не описанного ранее продукта – (9Z,11R,12R,13S)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты. В совокупности полученные данные дополняют и уточняют схему механизма каталитического действия ферментов семейства СУР74, проливают свет на их эволюционное происхождение, а также подтверждают их участие в защитных ответах растений против фитопатогенов.

После внимательного ознакомления с диссертационной работой существенных недостатков не было выявлено. Можно предположить, что работу хорошо бы дополнили данные по содержанию оксипинов в исследуемом объекте, что, к сожалению, не было

сделано. Однако, коллективом автора диссертационной работы ранее был проведен анализ профиля оксипинов в надземных частях родственного вида плаунка *S. martensii*, который позволил выявить редкое разнообразие дивиниловых эфиров в этом растении.

По тексту диссертации есть несколько замечаний/вопросов технического характера.

Стр. 18-19 В диссертации написано: «Цитохромы P450 бактерий – растворимые белки, в то время как все растительные цитохромы P450, как правило, связаны с мембранами. В этом случае они закрепляются на цитоплазматической поверхности эндоплазматического ретикула посредством коротких гидрофобных N-концевых участков и петель». Верное утверждение, если говорить только о цитоплазматических ферментах и не учитывать хлоропластные белки.

Стр. 53 «Размер генома этого растения является самым маленьким среди описанных геномов растений». Точнее будет сказать: «...одним из самых маленьких геномов».

Стр. 75 «В разделяющем геле происходило разделение образцов по молекулярным массам и зарядам». В присутствии детергента додецилсульфат натрия белки разделяются по массам, так как этот ионный детергент связывается с белками, денатурирует их, превращает все белки в отрицательно заряженные.

Стр. 90-91 Описывая рост бактериальной культуры для экспрессии рекомбинантных белков указано: «...начало логарифмической фазы роста, что соответствует значению оптической плотности 0,6 – 0,8 (при длине волны 600 нм)». Скорее всего автор имел в виду «конец логарифмической фазы роста».

Все указанные недочеты нисколько не снижают ценности рассматриваемой диссертационной работы. Смирновой Еленой Олеговной получены новые интересные данные, которые вносят существенный вклад в область исследований оксипинов растений. Представленная диссертационная работа – законченное исследование, соответствующее современному уровню научных знаний в биологии растений. Основные научные результаты, включенные в диссертационную работу, опубликованы в рецензируемых журналах и представлены на научных съездах и конференциях.

Считаю, что объем, качество и актуальность выполненных исследований соответствуют требованиям пунктов 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», установленного правительством РФ №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора

биологических наук, а соискатель Смирнова Елена Олеговна заслуживает присуждения  
искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 –  
«Физиология и биохимия растений».

**Савченко Татьяна Викторовна**

доктор биологических наук,  
специальность 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»,  
ведущий научный сотрудник с возложением  
обязанностей и.о. заведующего лабораторией  
фотосинтетического окисления воды  
Института фундаментальных проблем биологии  
Российской академии наук – обособленного  
подразделения Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«Пущинский научный центр биологических  
исследований Российской академии наук»



Т.В. Савченко

12 ноября 2020 года

Контактные данные

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

Почтовый адрес: 142290, гор. Пущино, ул. Институтская, д. 2

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

