

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Смирновой Елены Олеговны «Структурно-функциональные свойства
ферментов подсемейства СУР74М плаунка *Selaginella moellendorffii*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.05 — «физиология и биохимия растений».

Актуальность исследования. Оксипирины, продукты перекисного окисления липидов, представляют собой одну из наиболее многокомпонентных, широко распространённых и функционально значимых групп биологически активных соединений. Хотя изучение этих соединений привлекает внимание многих исследователей, многие вопросы данного направления до настоящего времени не решены и остаются среди наиболее острых проблем современной липидологии и физиологии в целом. До конца не исследованы пути метаболизма оксипиринов, механизмы их образования и дальнейших превращений, мало сведений о ферментах, катализирующих биосинтез и катаболизм оксипиринов у различных организмов, свойствах этих ферментов и кодирующих их генах. Несмотря на давнюю историю изучения, остается много вопросов о функциях оксипиринов в клетке и значимости для организма в целом. В свете этого большой интерес представляет изучение ферментов клана СУР74 цитохромов Р450, которые отвечают за синтез оксипиринов у широкого круга организмов. До сих пор наиболее изученными остаются ферменты СУР74 высших растений. Таким образом, выявление и характеристика ферментов СУР74 у организмов различных таксонов представляет собой крайне интересную задачу. Объектом исследования выбран плаунок *Selaginella moellendorffii*, одно из древнейших высших растений. Данный объект характеризуется

необычно широким разнообразием генов CYP74. Исследование такого объекта может способствовать выявлению новых эволюционных связей и путей генезиса этого клана ферментов и липоксигеназного каскада в целом. Настоящая работа вносит важный вклад в развитие исследований реакций липоксигеназного каскада, осуществляемых представителями научной школы академика РАН А.Н. Гречкина. В связи с вышесказанным, актуальность темы диссертационной работы Е.О. Смирновой, посвященной изучению структурно-функциональных свойств ферментов подсемейства CYP74M плауника *Selaginella moellendorffii*, не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования. Автором получен целый комплекс новых данных о ферментах клана CYP74M у *S. moellendorffii*: первичную последовательность кодирующих их генов, характеристику очищенных препаратов активных рекомбинантных ферментов этого подсемейства включая их субстратную специфичность, кинетические параметры и механизм каталитического действия, а также характеристику биологической активности продуктов соответствующих реакций. Показано, что ферменты CYP74M1 и CYP74M3 являются 13-специфичными дивинилэфирсинтазами (SmDES1 и SmDES2, соответственно), а фермент CYP74M2 — 13-специфичной эпоксиалкогольсинтазой (SmEAS). Следует отметить, что эти дивинилэфирсинтазы и эпоксиалкогольсинтаза — первые охарактеризованные ферменты такого типа у споровых растений.

Общая оценка работы. Работа изложена на 158 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Иллюстративный материал представлен 9 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 245 источников, из них — 237 на иностранных языках.

Во «Введении» диссертант аргументировано обосновывает постановку проблемы и её актуальность, четко определяет цели и задачи работы, отмечает научную новизну и научно-практическую значимость проведенного исследования. По мнению оппонента, существенным практическим достижением диссертанта является разработка системы получения и препаративной очистки цитохромов растений, потенциально применимая в промышленности для получения веществ с широким спектром биологической активности — продуктов реакций, катализируемых цитохромами суперсемейства P450.

Обзор литературы всесторонне и обстоятельно отражает современное состояние и перспективы выбранной темы исследований. На основе глубокого анализа имеющейся в литературе информации Е.О. Смирнова в ясной и информативной форме рассматривает такие вопросы, как метаболизм оксипинонов, физиологическое значение данных соединений, структура и функции ферментов семейства CYP74, их субстратная

специфичность, распространение и внутриклеточная локализация. Несомненный интерес представляет анализ филогенетических деревьев ферментов, входящих в клан СУР74, а также сходных с ними по аминокислотным последовательностям ферментов, с использованием средств биоинформатики. В итоге, при постановке цели исследования, подчеркивается значение *S. moellendorffii* как потенциального источника сведений, способных пролить свет на вопрос происхождения семейства ферментов СУР74 и генезис липоксигеназной сигнальной системы в целом.

Глава «Материалы и методы исследования» включает описание широко спектра современных методов биоинформатики, молекулярной биологии, биохимии и биофизики. Следует отметить исключительную подробность и тщательность описания автором использованных методов, реактивов и расходных материалов.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из 6 разделов и содержит подробное и логически связанное описание результатов и их интерпретацию.

Первый раздел посвящен «геномному майнингу» данных о нуклеотидных последовательностях участков геномов, кодирующих ферменты подсемейства СУР74М *S. moellendorffii*, а также их предполагаемых аминокислотных последовательностей. Приводится сравнительный анализ представленности данных ферментов и их генов у объекта исследования и иных изученных в этом отношении организмов, а также особенностей их первичной структуры.

Во втором разделе описан поиск оптимальной процедуры получения очищенных препаратов рекомбинантных белков СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3. Описание содержит ценную информацию о сложностях в получении данных рекомбинантных белков и возможных способах их преодоления.

Успешное решение задачи получения белков СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3 позволило авторам перейти к следующей задаче — исследованию субстратной специфичности рекомбинантных ферментов СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3 и кинетических параметров катализируемых ими реакций, чему и посвящен третий раздел работы. Анализ соотношения каталитической константы k_{cat} и константы Михаэлиса, КМ свидетельствовал о специфичности фермента СУР74М2 к субстратам 13-гидроперокси октадекатриеновой кислоты. Раздел 4 одержит описание экспериментов по идентификации продуктов каталитического действия рекомбинантных ферментов СУР74М1 и СУР74М3, а раздел 5 — описание соответствующих экспериментов для рекомбинантного фермента СУР74М2. Данная задача решалась с использованием широкого спектра хроматографических и спектральных методов, включая ВЭЖХ, ГХ-МС и спектральные методы (различные вариации ЯМР). Приводятся подробные

характеристики продуктов каталитического действия для каждого из ферментов, на основании полученных данных сделаны обоснованные предположения о механизмах действия этих ферментов. Установлено, что основными продуктами реакции фермента СУР74МЗ являются этероленовая и этеролева кислота, а фермент СУР74М1 является первой охарактеризованной дивинилэфирсинтазой, продуктами реакции которой являются (11Z)-изомеры этероленовой и этеролева кислот. Фермент СУР74М2 был идентифицирован как эпоксиалкогольсинтаза. Существенно, что этот фермент — первая истинная ЭАС, входящая согласно критериям номенклатуры в состав семейства СУР74 и первая ЭАС, обнаруженная у растений.

Заключительный, шестой раздел третьей главы диссертационного исследования, посвящён анализу и обсуждению экспериментальных данных о биологической активности продуктов каталитического действия обнаруженных и охарактеризованных дивинилсинтаз. В заключение раздела отмечается, что наличие комплекса ферментов синтеза биологически активных дивиниловых эфиров у древнейших сосудистых растений отдела плауновидные, возможно, является одним из факторов, которые обусловили их устойчивость к биотическим стрессам, а значит и повсеместное распространение и сохранение до настоящего времени

В заключении к работе даётся обобщение полученных экспериментальных фактов, приводится их краткое обсуждение в контексте цели и задач диссертационного исследования и накопленных в литературе данных. Обнаружение ферментов СУР74 у зеленых водорослей, печеночников, мхов и плаунов свидетельствует о том, что липоксигеназный каскад появился уже на заре эволюции кислородных фототрофных организмов. Автор заключает, что наличие ферментов, которые участвуют в синтезе биологически активных оксипинов у древнейших сосудистых растений, помогло им распространиться и сохраниться до настоящего времени.

Работа качественно оформлена, это относится и к рукописи диссертации, и к автореферату. Материал изложен хорошим литературным языком, представлено много информативных схем, облегчающих восприятие и понимание работы.

Принципиальных возражений валидности результатов исследования и обоснованности их интерпретации у оппонента не возникло. Анализ представленных результатов и их обсуждения позволяет заключить, что в ходе работы все 5 задач решены в полной мере; соответствующие результаты отражены в 5 выводах.

При всех указанных достоинствах представленной диссертации хотелось бы отметить следующие вопросы и замечания:

1. Задача исследования под номером 5 должна быть сформулирована более конкретно,

поскольку изучались конкретные эффекты на конкретных аспектах (ингибирование жизнеспособности определённых штаммов фитопатогенных бактерий). В то же время вполне вероятно наличие у исследованных соединений и других видов биологической активности.

2. Какова была стабильность препаратов гидроперекисей, полученных в работе? Контролировали ли сохранность хранящихся препаратов гидроперекисей перед использованием в реакциях и, если да, то как?
3. Взят ли коэффициент молярной экстинкции гидроперекисей жирных кислот из литературы или определён автором самостоятельно? В первом случае необходимо привести ссылку, а во втором — описание процедуры и указать конкретные вещества, использованные для определения коэффициента экстинкции.
4. Судя по тексту работы, анализ биологических эффектов продуктов каталитического действия фермента СУР74М2 не проводили. Чем это обусловлено?
5. Можно ли высказать более конкретные предположения о механизмах бактерицидного и бактериостагического эффекта продуктов каталитического действия ферментов–дивинилсинтаз СУР74М1 и СУР74М3?

В целом, следует отметить, что высказанные замечания никоим образом не влияют на общую высокую ценность представленной к защите диссертации и на ее результаты и выводы.

Считаю, что диссертационная работа Е.О. Смирновой представляет собой законченное и оригинальное исследование в актуальной области современной физиологии и биохимии растений, выполненное на самом современном уровне и содержащее новые факты, а также важные обобщения. Результаты, полученные диссертантом, представляют большой теоретический и практический интерес и могут быть использованы в дальнейшей разработке проблем метаболизма липидов и липоксигеназного каскада в частности. Е.О. Смирнова продемонстрировала незаурядные способности к научным исследованиям, разработке актуальных научных проблем, имеющих важное теоретическое и практическое значение. Все основные результаты диссертации опубликованы в научной печати. Содержание автореферата соответствует основным положением диссертации.

Таким образом, рассмотренная диссертационная работа Смирновой Елены Олеговны «Структурно-функциональные свойства ферментов подсемейства СУР74М плаунка *Selaginella moellendorffii*» полностью отвечает требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по

