

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Старикова Александра Юрьевича «Изучение субстратной специфичности десатураз жирных кислот цианобактерий», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений

Актуальность

Липиды мембран живых организмов являются чрезвычайно пластичной средой, реагирующей на самые разнообразные внешние и внутренние стимулы. Среди них изменение температуры, светового режима, водного и кислотно-щелочного баланса, гормональные и негормональные перестройки обмена веществ в процессе развития, различного рода взаимодействия с другими организмами, в том числе патогенными. В подобных условиях реакция липидного компонента выражается в изменении соотношения отдельных молекулярных видов липидов, отличающихся структурой гидрофильной головы и составом гидрофобных жирных кислот с разной длиной углеводородной цепи, количеством и положением двойных связей. Результатом комбинации этих параметров является огромное структурное разнообразие липидов, позволяющее организмам не только адаптироваться к воздействиям среды, но и совместно с другими мембранообразующими соединениями служить основой морфологической неоднородности отдельных клеточных структур, а также самих клеток, тканей, органов.

Интерес к феномену липидной гетерогенности, связанный с появлением высокоточных масс-спектрометрических технологий, в последние годы неуклонно растет. Совершенствование мягких методов ионизации биомолекул, таких как электрораспыление и матрично-лазерная десорбция с ионизацией, привело к тому, что масс-спектрометрия стала весьма широко применяться в исследованиях липидов, а развитие тандемной масс-спектрометрии повысило надежность их идентификации. Появление многочисленных данных по составу липидного профиля с высокой долей аннотированных до молекулярного вида соединений позволило по новому взглянуть на липидный метаболизм, в частности, предположить наличие новых путей биосинтеза и катаболизма, расширить список липидов с регуляторной активностью, а также выявить липидные маркеры, ассоциированные с патологическими процессами. Среди вопросов, которые особенно актуальны на современном этапе, – физиологический смысл липидной гетерогенности и пути ее реализации.

Диссертация А.Ю. Старикова посвящена исследованию десатураз цианобактерий – ферментов липидного метаболизма, катализирующих образование двойных связей в углеводородных цепях жирных кислот. Основное внимание в ней уделено специфичности этих ферментов в отношении длины цепи жирной кислоты и способа отсчета при образовании двойной связи. Результаты работы вносят весомый вклад в понимание механизмов, обеспечивающих структурную гетерогенность мембранных липидов. Поскольку десатуразы, добавляя двойную связь, меняют химические свойства липидных молекул, такие как пространственная организация, температура плавления, окисляемость, их активность влияет на многие клеточные процессы: физико-химическое состояние мембран, активность мембранных ферментов, ионных каналов, рецепторов,

биосинтез регуляторных молекул. Таким образом, новые сведения о свойствах десатураз способствуют развитию представлений о регуляции клеточных функций в целом, в т.ч. связанных с внутренними процессами и взаимодействием с внешней средой.

Научная новизна

А.Ю. Стариковым на искусно сконструированном биологическом материале, включая дикий тип и трансформанты цианобактерии *Synechococcus elongatus*, синтезирующие несвойственные виду полиненасыщенные жирные кислоты за счет экспрессии генов десатураз, перенесенных из цианобактерий с разными путями десатурации липидов, впервые получены результаты, демонстрирующие механизм внесения двойной связи $\Delta 6$ - и $\Delta 12$ -десатуразами. Получены убедительные данные о путях формирования липидов, этерифицированных короткоцепочечными миристиновой и (C14:0) и миристоолеиновой (C14:1 ^{$\Delta 9$}) жирными кислотами.

Результаты исследования опровергают устоявшееся представление относительно происхождения второй двойной связи в ω -6 липидах с линолевой кислотой (18:2 ^{$\Delta 9,12$}), которую, как считалось, вносит $\Delta 12$ - или ω -6-десатураза (DesA), отсчитывающая атомы углерода «классическим способом» – от сложноэфирного или метильного конца жирнокислотной цепи. В диссертации и опубликованной по ее материалам работе «Delta or Omega? ...» (Starikov et al., 2020) показано, что у цианобактерий DesA вносит вторую двойную связь, отступив три атома углерода от первой двойной связи в сторону метильного конца. Таким образом, десатураза распознает двойную связь, а не конец ацильной цепи, что, несомненно, является новым фактом для ацил-липидных десатураз цианобактерий. При этом, по-видимому, для фермента характерна региоселективность, десатураза в разной степени активна по отношению к C16:1 ^{$\Delta 9$} , C18:1 ^{$\Delta 9$} , C17:1 ^{$\Delta 10$} , C18:1 ^{$\Delta 11$} кислотам. Напротив, для $\Delta 6$ -десатуразы (DesD) типичным является внесение двойной связи вне зависимости от длины и ненасыщенности ацильной цепи (Starikov et al., 2022). Иными словами, она может выступать и как начальная, и как промежуточная, и как терминальная десатураза, что также опровергает традиционное представление о последовательности реакций десатурации полиненасыщенных жирных кислот цианобактериями.

Теоретическая и практическая значимость

Значимость изучения липидного метаболизма цианобактерий, с целью их дальнейшего использования в различных отраслях промышленности, энергетике, медицине очевидна. Это связано с рядом структурных особенностей липидов цианобактерий, делающих их чрезвычайно интересным объектом, как в фундаментальном, так и прикладном отношении. К таким особенностям можно отнести способность синтезировать различные вторичные метаболиты, липопептиды и др., содержащие в своем составе жирнокислотный фрагмент и обладающие высокой биологической активностью (Fewer et al., 2021). Не менее важным с прикладной точки зрения свойством является способность аккумулировать липиды, этерифицированные только насыщенными и мононенасыщенными жирными кислотами или, напротив, полиненасыщенными α -, γ -линоленовыми и стеариноновой кислотами (Toepel et al., 2023). Здесь следует отметить четкую дифференцировку видов цианобактерий в связи с наличием/отсутствием ферментов липидного метаболизма, а именно десатураз, что выражается в

принципиальных различиях липидного состава, который, как отмечает автор, закономерно коррелирует с экологией видов.

Знание механизмов, регулирующих избирательность десатураз по отношению к субстрату, может стать ключевым инструментом при поиске видов цианобактерий, являющихся активными продуцентами различных биологически активных липидов.

Основная часть

Диссертация А.Ю. Старикова построена по традиционной схеме: состоит из введения, главы «Обзор литературы», двух глав, имеющих непосредственное отношение к экспериментальной части работы («Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение»), заключения, выводов, списков сокращений и литературы, приложения. Список литературы включает 188 источников. Работа содержит 6 таблиц и 31 рисунок, таблица с использованными праймерами и хроматограммы метиловых эфиров жирных кислот вынесены в приложение. Общий объем диссертации составляет 132 страницы.

Во **введении** обосновывается актуальность изучения цианобактерий, в частности их фундаментального значения для понимания биохимической эволюции растений. Рассматриваются примеры их практического применения, в том числе для получения биотоплива, очистки сточных вод, синтеза метаболитов, например, полиненасыщенных линоленовой и стеаридоновой жирных кислот. На примере штамма цианобактерии *Synechocystis* sp., обладающей полным набором десатураз, четко и лаконично с использованием схемы, описывается каноническое представление о порядке внесения двойных связей в жирные кислоты гликолипидов и фосфатидилглицерина ацил-липидными десатуразами. Демонстрация этой схемы во введении способствует лучшему пониманию проблематики исследования, формулировки цели и задач.

Также во введении представлены научная новизна и практическая значимость работы, приведены результаты апробации и сведения о публикациях. Описывается личный вклад автора в представленную работу.

Обзор литературы состоит из трех разделов. В первом разделе приводятся сведения о биосинтезе жирных кислот. Во втором – более развернуто, о самом предмете исследования, десатуразах жирных кислот цианобактерий, высших растений, водорослей, грибов и нефотосинтетических прокариот, а также структуре десатураз, их регуляторной роли и механизмах внесения двойной связи. В третьем разделе рассмотрен биотехнологический потенциал цианобактерий и микроводорослей. В целом весь обзор подготавливает читателя к восприятию основных результатов, полученных автором. Он написан хорошим языком и демонстрирует умение работать с литературой. Несмотря на то, что монографий и обзоров по данной тематике опубликовано много (Los, Murata, 1998; Kinney, Cahoon, 2002; Harwood, Guschina, 2009; Лось, 2014; Garba et al., 2017; Xiao et al., 2022; Halim et al., 2022; Cerone, Smith, 2022 и др.), автору удалось найти свой оригинальный подход к подаче материала. В представленном обзоре проведено противопоставление структур и свойств ферментов метаболизма жирных кислот, в первую очередь десатураз цианобактерий и высших растений. Такой подход способствует формированию представления об эволюции данных ферментов, что в работе, где в качестве объекта исследования использованы одни из древнейших организмов, весьма существенно. Также, большой интерес представляет подборка

данных о результатах интродукции генов различных десатураз в организмы, не способные синтезировать липиды, которые эти гены кодируют, а также примеры других трансформаций. Отдельно хочу отметить приведенные факты, свидетельствующие об особой природе $\Delta 12$ -десатуразы, в частности, ее $\Delta 12/\Delta 15$ бифункциональности, способности проявлять $\Delta 12$ -ацетиленазную активность. Появление в эволюции фермента подобных дивергенций может говорить о древнем происхождении $\Delta 12$ -десатуразы, важной роли в формировании специфической ферментативной активности и представлять интерес с точки зрения развития новых биотехнологий.

Среди замечаний к обзору литературы отмечу следующие.

- В описании ацетил-КоА карбоксилаз фотосинтезирующих организмов, а именно цианобактерий и высших растений, допущена неточность. Не все ацетил-КоА карбоксилазы растений являются гетеромерными ферментами, как сказано на стр. 13. Подобная структура характерна лишь для пластидных ацетил-КоА карбоксилаз двудольных растений. Напротив, цитоплазматические ацетил-КоА карбоксилазы, а также пластидные однодольных растений являются единичными полипептидами из нескольких субъединиц, т.е. гомомерными ферментами (Takano et al., 2021).
- Кажется малообъяснимыми сведения о том, что «основным субстратом десатураз являются ацильные остатки фосфатидилсерина» (стр. 24), тем более, что они не подкреплены ссылками на литературные источники. Учитывая, что основным путем синтеза фосфолипидов у растений является путь Кеннеди, где диацилглицерин вступает в реакцию с CDP-холином или CDP-этаноламином с образованием фосфатидилхолинов или фосфатидилэтаноламинов, соответственно, т.е. минуя стадию декарбоксилирования фосфатидилсеринов, преимущественное вовлечение фосфатидилсеринов в реакции десатурации вызывает сомнения. Более естественной и логичной в «эукариотическом» пути синтеза, т.е. на мембранах ЭПР, является десатурация конечных продуктов фосфолипидного биосинтеза – фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов. Последние нередко упоминаются в литературе, как естественные субстраты десатураз у растений (Nachtschatt et al., 2020).

Оценивая главу, посвященную **материалам и методам**, хочу обратить внимание на тщательно подобранные объекты исследования. Цианобактерия *Synechococcus elongatus* PCC 7942, выбранная в качестве акцепторного штамма, а также цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Gleobacter violaceus* PCC 7421, *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, послужившие донорами генов изучаемых десатураз, варьировали по составу основных классов липидов, длине ацильных фрагментов, составу имеющихся десатураз. Этот набор объектов исследования, а также грамотно спланированные эксперименты обеспечили надежную аргументацию всех полученных результатов.

Также, хотелось бы отметить подробное описание условий культивирования цианобактерий, последовательности работ по молекулярному клонированию и получению транскриптов. Полное и прозрачное описание методик экстракции, хроматографического разделения липидов, получения метиловых эфиров жирных кислот, а также 4,4-диметилксазолиновых и 3-пиридилкарбинильных производных жирных кислот для

последующего GC-MS анализа также существенно повышает ценность работы. Однако имеется ряд замечаний.

- Из описания всех использованных в работе штаммов микроорганизмов, приведенного в начале раздела, непонятно, кто являлся донором, а кто реципиентом генов десатураз в проведенных экспериментах. Более четкое разграничение роли каждого организма, а еще лучше приведение схемы эксперимента, обеспечило бы лучшее восприятие материала.
- Весьма скупо описаны условия масс-спектрометрического анализа моногалактозилдиацилглицеринов на приборе Shimadzu 8040. В частности, не указаны основные характеристики прибора: источник ионизации, масс-анализатор, а также значения ряда важных параметров (полярность ионизации, напряжение на капилляре, температурный режим, диапазон сканируемых масс). Например, отсутствие описания режима анализа, которых для тройного квадруполя может быть несколько, не позволяет разобраться, каким образом получены MS/MS спектры.
- Имеются ошибки в общепринятых сокращениях, например, единица измерения массы «микрограмм» сокращена как « μ г» (стр. 60-62), а «грамм» как «гр» (стр. 65). То же и с дольными единицами измерения длины – « μ м» вместо «мкм» или « μ m».

В первом разделе главы, посвященной **результатам и их обсуждению**, описана суть эксперимента – сравнение акцепторного штамма с трансформантами, выросшими на обычной питательной среде и на среде с добавленными моноеновыми жирными кислотами, включая естественную, но минорную вакценовую (C18:1 Δ^{11}) и нетипичную для вида гептадеценовую (C17:1 Δ^{10}). Далее описана последовательность, а также дана оценка результатов трансформации акцепторного штамма геном slr 1350 из *Synechocystis* sp. PCC 683 и геном glr 2623 из *Gleobacter violaceus*, отвечающими за активность Δ 12-десатуразы. Результаты хорошо обоснованы и снабжены иллюстрациями, где представлены результаты разделения геномной ДНК всеми видами цианобактерий, ПЦР продуктов, полученных на стадии клонирования генов интереса, а также при оценке трансформации линий *S. elongatus*. Здесь же приведены результаты сравнительного анализа липидов дикого типа и трансформантов, которые свидетельствуют как об активности экспрессируемых десатураз, так и об их субстратной специфичности в отношении класса липидов. На основании результатов эксперимента с экзогенными жирными кислотами автором сделан обоснованный вывод о способности Δ 12-десатураз взаимодействовать с ацильными остатками разной длины (C16-C18, но не C14) и положением первой двойной связи. Отдельно представлены результаты, свидетельствующие о том, что вторая двойная связь вносится Δ 12-десатуразой в мононенасыщенные ацильные группы на расстоянии трех атомов от первой двойной связи в сторону метильного конца. Эти заключения сделаны на основании анализа фрагментов, полученных в ходе ESI-QqQ-MS/MS и GC-MS экспериментов. Интерпретация масс-спектрометрических результатов проведена грамотно и не вызывает каких-либо возражений.

Второй раздел посвящен изучению способа отсчета при образовании двойной связи Δ 6-десатуразами. Аналогичный по дизайну эксперимент, в котором сравнивали дикий тип *Synechococcus elongatus* PCC 7942, его трансформант, экспрессирующий ген desD (*sl*

026), и те же культуры, выращенные на средах с экзогенными жирными кислотами, ясно продемонстрировал, что $\Delta 6$ -десатураза взаимодействует не только с моноеновыми, но и насыщенными кислотами. Также, в отличие от $\Delta 12$ -десатуразы, она способна десатурировать короткие ацильные группы C_{14} ряда. Для определения всего многообразия продуктов $\Delta 6$ -десатуразы были получены пиридилкарбинильные производные, масс-спектры которых в отличие от других производных имеют ряд специфических особенностей, позволяющих сделать более обоснованные предположения о положении двойной связи в ацильной группе. Результаты интерпретации полученных масс-спектров, включая масс-спектр необычной структуры $C_{17:2} \Delta 6,10$ с бис-метиленовым разделением двойных связей, аргументированы и подкреплены ссылками на данные масс-спектрометрических библиотек.

Третий раздел посвящен исследованию специфичности $\Delta 9$ -десатуразы к длине ацильной цепи, а также ее взаимодействию с ацилтрансферазой. Донором соответствующих генов послужил штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, отличающийся наличием высокого содержания миристиновой ($C_{14:0}$) и миристолеиновой ($C_{14:1} \Delta 9$) кислот. На основе *Synechococcus elongates* были созданы трансформанты, включая двойной трансформант, по генам *plsC* и *desC1*. Анализ жирных кислот липидов показал, что ацилтрансфераза играет важную роль в метаболизме короткоцепочечных жирных кислот, а именно, обеспечивает их включение в состав мембранных липидов, в то время как $\Delta 9$ -десатураза способствует этому процессу, одновременно выполняя свою основную функцию – катализирует образование миристолеиновой кислоты. Однако пальмитиновая кислота оказалась для нее более предпочтительным субстратом. По результатам работы сделан вывод о том, что необычный состав липидов *Cyanobacterium* sp. обусловлен совместной активностью ацилтрансферазы, обеспечивающей этерификацию липидов разнообразными жирными кислотами, включая миристиновую, и $\Delta 9$ -десатуразы, катализирующей образование двойных связей преимущественно в кислотах C_{16} и C_{14} ряда. Данный раздел не потребовал проведения серьезных исследований структуры липидов, однако сделанные по его результатам выводы стали важным дополнением для формирования представлений об участии десатураз и ацилтрансфераз в метаболизме липидов у цианобактерий. Из замечаний к разделу, посвященному результатам, приведу следующие.

- Как видно из табл. 3, рис. 18 и рис. А, Б, В из приложения 3 активность $\Delta 12$ -десатуразы проявлялась неодинаково по отношению к разным классам липидов. Наибольшую активность фермент проявлял при использовании в качестве субстрата фосфатидилглицеринов, наименьшую – сульфоиновозилдиацилглицеринов. В обсуждении и выводах этот факт оставлен без внимания. В дальнейшем, при изучении свойств $\Delta 6$ - и $\Delta 9$ -десатураз, специфичность ферментов по отношению к классу липидов вообще не была запланирована. Возможно, этому есть какое-то логическое объяснение.
- В работе допускаются обобщения в ущерб точности формулировок. Так, например, по результатам исследования делается вывод, что $\Delta 12$ -десатураза вносит вторую двойную связь независимо от длины цепи ацильной группы. Аналогично, относительно $\Delta 6$ -десатуразы говорится, что она отсчитывает 6 атомов углерода от карбонильного конца независимо от наличия предсуществующей двойной связи. Тем не менее, зная стереохимию ненасыщенных жирных кислот, существующих в

более или менее устойчивых конформациях в зависимости от положения двойных связей, можно предположить, что десатуразы индифферентны в определенных пределах. Даже при взаимодействии с экзогенным субстратом, они будут катализировать образование молекул близких по структуре к большинству природных. Например, n-3, n-6, n-7, n-9, но не n-1, n-2; метиленразделенных, но не конъюгированных.

Общая характеристика работы

Исследование А.Ю. Старикова посвящено механизмам, связанным с каталитической функцией основных ацил-липидных десатураз цианобактерий – Δ9-десатуразы (DesC), Δ12-десатуразы (DesA), Δ6-десатуразы (DesD), а именно их специфичности по отношению к длине и/или степени ненасыщенности ацильной цепи субстрата. Основным вопросом, который интересовал автора, это способ отсчета атомов углерода при образовании двойной связи (от метильного или сложноэфирного конца цепи, или от предсуществующей двойной связи). Вопрос – конкретный, а также очень насущный, основанный на опыте не одного поколения специалистов, занимавшихся и занимающихся исследованием десатураз. Эта предыстория определила основу диссертации: четко поставленная цель потребовала постановки конкретных задач и, как следствие, выверенных решений.

Исследование можно разбить на два значительных этапа. Первый – получение трансформантов, экспрессирующих гены несвойственных виду десатураз. На данном этапе потребовалось подобрать вид-реципиент с ограниченным набором десатураз, виды-доноры с активными десатуразами, представляющими интерес, выделить и клонировать гены интереса, провести трансформацию, а затем оценить ее успешность. Эта работа была связана с освоением многих современных приемов, используемых в молекулярной биологии. Качество полученных трансформантов стало залогом успешного решения основных задач. Второй этап заключался в изучении субстратной специфичности десатураз, кодируемых конкретными генами, для чего были проведены наблюдения за изменением состава эндогенных жирных кислот липидов трансформантов, а также выполнен эксперимент с экзогенными нетипичными для цианобактерий жирными кислотами. Основной, весьма нетривиальной задачей на данном этапе стало проведение структурного анализа синтезируемых трансформантами сложных липидов и их жирных кислот с определением длины цепей и положения двойных связей. Поскольку среди них были продукты десатурации необычной цис-10-гептадеценовой (C17:1^{Δ10}), их поиск потребовал использования целого арсенала методов химика-аналитика, в том числе получения разного типа производных жирных кислот, их масс-спектрометрический анализ с различными способами ионизации молекул, непростая интерпретация масс-спектров.

Оценивая работу в целом, можно констатировать, что тема исследования актуальна и полностью соответствует заявленной научной специальности. Существующая литература проанализирована с достаточной полнотой и глубиной; использованные автором подходы и методы современны, результаты убедительны и логически непротиворечивы, выводы адекватны поставленным задачам. Фундаментальным итогом выполнения работы стало понимание механизмов образования двойных связей, на уровне субстратной специфичности, основными десатуразами цианобактерий. Результаты работы могут быть экстраполированы, с известными ограничениями, на десатуразы других живых организмов. Полученная коллекция трансформантов может быть использована в

дальнейших исследованиях десатураз цианобактерий. Выявленные характеристики десатураз могут послужить основой биотехнологических разработок, связанных с получением цианобактерий с заданными свойствами.

Диссертация Старикова Александра Юрьевича «Изучение субстратной специфичности десатураз жирных кислот цианобактерий» является научно-квалификационной работой, оформленной на основании проведенного диссертантом законченного содержательного исследования с обоснованными выводами. По актуальности, поставленным целям и задачам, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, их научной и практической значимости представленная работа полностью отвечает требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24.09.2013 г, а ее автор, Стариков Александр Юрьевич, несомненно, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – «физиология и биохимия растений».

Сведения об оппоненте

Фамилия, имя, отчество

Котлова Екатерина Робертовна

Ученая степень с указанием шифра и наименования научной специальности, по которой защищена диссертация, ученое звание

кандидат биологических наук (1.5.21 – Физиология и биохимия растений; 03.02.12 – Микология), ученое звание – нет

Организация (место работы) и адрес организации, подразделение (кафедра, лаборатория), должность, телефон, электронная почта

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН);

197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2

+7 (812) 372-54-08

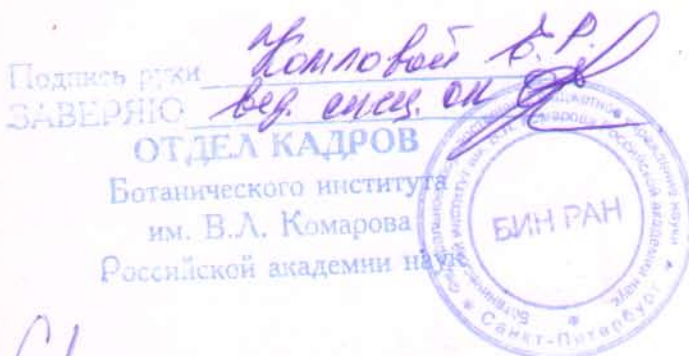
EKotlova@binran.ru

Лаборатория аналитической фитохимии

ведущий научный сотрудник

в.н.с. лаб. аналитической фитохимии
Ботанического Института РАН, к.б.н.

05.05.2023



Котлова Екатерина Робертовна