

Проректор по научной работе ДВФУ

А.С. Самарлак

« 10 » апр 2023 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» (ДВФУ)

на диссертацию Старикова Александра Юрьевича на тему: «Изучение субстратной специфичности десатураз жирных кислот цианобактерий», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки)

Актуальность темы диссертации и научная новизна полученных результатов.

Исследование молекулярных механизмов действия ферментов, к которым относятся десатуразы жирных кислот цианобактерий (иначе сине-зелёных водорослей), является предметом одной из основных областей современной биохимии – энзимологии, а также физиологии растений. В свою очередь результаты этих исследований важны для одного из наиболее перспективных направлений развития биотехнологии, которое предполагает использование как природных ферментов, так и их рекомбинантных аналогов. Цианобактерии, являясь фотоавтотрофными прокариотами, обладают уникальным метаболизмом жирных кислот, позволяющим цианобактериям не только синтезировать жирные кислоты, но и, в отличие от других организмов, модифицировать их с помощью большого набора ферментов, включая десатуразы жирных кислот, для последующего построения липидов мембран, жидкостность и, следовательно, функциональное состояние которых определяется содержанием в них ненасыщенных жирных кислот. Необычным также является способность цианобактерий усваивать экзогенные жирные кислоты при отсутствии бета-окисления. В связи с быстрым размножением в культуре, цианобактерии являются удобными объектами для изучения и уточнения свойств ферментов десатураз, ответственных за биосинтез ненасыщенных жирных кислот, что имеет фундаментальное и прикладное значение. Несмотря на то, что роль десатураз цианобактерий в биосинтезе жирных кислот описана давно, оригинальность и приоритетность, а, следовательно, научная новизна полученных автором результатов заключается, прежде всего, в том, что впервые экспериментально продемонстрирован порядок внесения двойных связей в ацильные остатки ацил-липидными $\Delta 12$ - и $\Delta 6$ -десатуразами в цианобактериях, а также

установлена ответственная роль Δ^9 -десатуразы, специфичной к миристиновой кислоте, в формировании необычного состава жирных кислот у *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 по сравнению с другими штаммами цианобактерий.

Практическая ценность. Исследование расширяет недостаточно разработанные или полностью отсутствующие в науке представления о свойствах, механизмах действия десатураз на примере десатураз жирных кислот цианобактерий. Спектр практического использования полученных данных очень широк: от таксономических и экофизиологических потребностей до разработок рациональных, сбалансированных диет, необходимых для поддержания здоровья населения, и возобновляемого биотоплива. Материал диссертации может быть рекомендован для использования при подготовке студентов и аспирантов, специализирующихся в области молекулярной биологии, биохимии и физиологии растений, микробиологии и биотехнологии.

Достоверность и обоснованность полученных результатов и выводов. Сделанный автором обзор состояния проблемы изучения биосинтеза жирных кислот и роли в нем десатураз цианобактерий в сравнении с водорослями и другими растениями, а также нефотосинтезирующих прокариот позволил диссертанту обосновать выбор показателей и методов для проведения собственных исследований. Объем исследований является достаточным для получения достоверных результатов и выводов. Достоверность результатов обеспечена использованием адекватных, современных методов исследования. Все выводы сделаны на основе статистической обработки данных.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 132 страницах, иллюстрирована 32 рисунками, содержит 6 таблиц и 4 приложения. Она включает Введение и три главы: Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение. В конце приводятся Заключение, Выводы, Список сокращений и условных обозначений и Список литературы, содержащий 188 публикаций.

Во Введении автор обосновывает актуальность темы исследования, исходя из ее научной новизны и практической значимости, формулирует цель и задачи исследования, а также основные положения, выносимые на защиту.

В первой части «Обзора литературы» дан сравнительный анализ особенностей биосинтеза жирных кислот в цианобактериях и родственной им грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*, а также в фото- и нефотосинтезирующих эукариотических организмах. Далее анализ распространяется на биосинтез липидов, в который включаются синтезированные жирные кислоты, что выглядит рациональным и логичным, хотя и выходит за рамки, обозначенные в названии этой части – «1.1. Биосинтез ЖК».

Вторая часть Обзора посвящена десатуразам жирных кислот, их классификации, распространению, где особое внимание уделено десатуразам цианобактерий. Дается представление о номенклатуре цианобактериальных десатураз, истории их изучения, что сопровождается глубоким сравнительным анализом свойств и структуры десатураз, экспрессии соответствующих генов при изменении температуры окружающей среды. Так как цианобактерии являются прародителями хлоропластов растений, то в Обзоре приводятся подробные сведения о десатуразах высших растений и водорослей в противопоставлении с нефотосинтезирующими организмами (грибами и прокариотами). Особый интерес вызывает описание современных представлений о механизме десатурации, что в свою очередь логично завершается информацией о роли десатураз цианобактерий в термоадаптации и перспективах их использования в биотехнологии.

Материалы и методы, использованные в работе, многообразны, современны и адекватны поставленным задачам. В качестве объектов исследования было использовано 4 штамма цианобактерий и 1 штамм *Escherichia coli*, для культивирования которых были использованы разные условия. В работе был применен целый спектр методов молекулярной биологии от комплекса методов для молекулярного клонирования до трансформации клеток цианобактерии и транскриптомного анализа. Для определения состава жирных кислот в объектах исследования использовались такие традиционные методы липидологии, как экстракция липидов и их разделение с помощью тонкослойной хроматографии, а также высокорецизионные современные хроматографические методы как ГЖХ, ВЭЖХ и газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС), что говорит о высоком уровне квалификации и основательной методической работе соискателя.

Результаты и их обсуждение изложены в 3 разделах (хотя нумерация разделов перепутана). В первом из них приводятся данные, полученные автором при определении порядка введения двойной связи ацил-липидными $\Delta 12$ -десатуразами цианобактерий. С этой целью автором был применен изящный методический подход: штамм *Synechococcus elongatus* PCC 7942, имеющий только $\Delta 9$ -десатуразу, был трансформирован генами $\Delta 12$ -десатураз из двух штаммов цианобактерий - *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Сравнительный анализ состава жирных кислот выявил в трансформированных штаммах значительное содержание $16:2\Delta^{9,12}$ и $18:2\Delta^{9,12}$ жирных кислот. Тогда как включение в трансформанты экзогенных *цис*-вакценовой ($18:1\Delta^{11}$) или гептадеценовой ($17:1\Delta^{10}$) кислот приводило к возрастанию продукции $18:2\Delta^{11,Y}$ или появлению $17:2\Delta^{10,X}$ соответственно, из чего был сделан правомерный вывод о способности изучаемых десатураз взаимодействовать не только с $\Delta 9$ -ЖК. Методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) установлено, что диеновые производные

использованных экзогенных ЖК включаются исключительно в состав липидов мембран *Synechococcus elongatus*, трансформированной геном *slr1350*, что убедительно свидетельствует об экспрессии $\Delta 12$ -десатураз в трансформанте. Использование tandemной масс-спектрометрии позволило автору провести более тонкий анализ и показать особенности субстратной специфичности ацил-липидной $\Delta 12$ -десатуразы цианобактерий: внося вторую двойную связь, что не зависит от длины жирной кислоты, фермент «отсчитывает» три атома углерода от предсуществующей двойной связи в сторону метильного конца.

Во втором разделе приводятся и обсуждаются результаты изучения способа «отсчета» при образовании двойной связи ацил-липидными $\Delta 6$ -десатуразами цианобактерий. Для исследования автором были применены аналогичные методические приёмы, позволившие показать, что $\Delta 6$ -десатуразы цианобактерий «отсчитывают» 6 атомов углерода от карбоксильного конца независимо от длины цепи ЖК и наличия в ней предсуществующей двойной связи.

Последний раздел посвящен результатам исследования субстратной специфичности $\Delta 9$ -десатуразы цианобактерий. Ко-экспрессия генов ацилтрансферазы и $\Delta 9$ -десатуразы из *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 в клетках *Synechococcus elongatus* выявила, что за формирование необычного состава жирных кислот у *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 отвечают совместно ацилтрансфераза, специфичная к миристиновой кислоте, и $\Delta 9$ -десатураза, способная взаимодействовать в равной степени как с миристиновой, так и с пальмитиновой кислотами.

В Заключении автор подводит итог проделанной работе, делая акцент на своих главных, наиболее существенных находках. Необходимо отметить логичность и рациональность в изложении как Заключения, так и всей диссертации в целом, что говорит как о глубоких теоретических знаниях, которые диссертант активно использовал для введения в суть экспериментов и при обсуждении полученных результатов, так и свободном владении простыми методами, применёнными в экспериментальной части. После Заключения приводятся Выводы.

По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 7 статей, опубликованных в международных рецензируемых журналах, включённых Высшей аттестационной комиссией России в список изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата и доктора наук, и 5 тезисов докладов. Результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на 5 международных и всероссийских конференциях.

Представленные выводы конкретны, соответствуют полученным экспериментальным результатам и имеют адекватное теоретическое обоснование. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы, кратко резюмирует её основные положения, достаточно информативно описывает основные этапы проведённых исследований.

Однако нельзя не высказать ряд **вопросов и замечаний к диссертации**:

1. В цели работы, а также в выводах 1 и 2 нет указания на объект исследования – цианобактерии.

2. По всему тексту: *et al.* – это аббревиатура латинских слов «*et alia*», поэтому пишется курсивом.

3. С. 14. Требуется уточнить: в *E. coli* не две, как это следует из текста, а три тиоэстеразы (см. Ravoncello *et al.*, 2022) участвуют в деградации ЖК.

4. С. 16. В чём смысл разъяснения «...десатуразы ЖК цианобактерий и хлоропластов являются аэробными ферментами»? Известны анаэробные десатуразы?

5. С. 68. Рис. 11. В чём смысл использованного для электрофореза маркера длин ДНК (М) без соответствующей шкалы?

6. В диссертации написаны различные идентификаторы генов (например, *glr2623*), но не указаны ссылки на сами последовательности (например, номер доступа в GenBank или регион в последовательности генома, депонированного в GenBank). На С. 124 в приложении 1. К таблице праймеров следовало бы добавить дополнительные колонки с указанием цели использования этих праймеров и последовательности, на которую они садятся. Также в приложении 1 указаны не все праймеры, использованные в работе.

7. С. 60. К предложению «Процедура трансформации *S. elongatus* давно известна и активно применяется в современных исследованиях.» необходимы ссылки на исследования.

8. С. 73, рисунок 15. Чтобы доказать специфичность праймеров в качестве ещё одного отрицательного контроля следовало бы использовать кДНК нетрансгенного *Synechococcus elongatus* с праймерами к гену *slr1350*, и ещё одного отрицательного контроля – кДНК *Synechococcus elongatus* с праймерами к гену *glr2623*.

9. Рисунок 18 имеется и на странице 77, и на странице 81.

10. Рисунок 28. Сигналы в положительных контролях отличаются по длине. В подписях к фореу, вероятно, содержатся какие-то ошибки. Что означают «1 (линия *desC+plsC*)» и «2 (*desC+plsC*)»? Почему их ПЦР-продукты разной длины? Почему в подписи к рисунку 28 написано «*desC+plsC*», а к рисунку 27 – «*desC1200+plsC1200*»?

11. С. 94. Вероятно, здесь ошибка в ссылке на рисунок 14, поскольку сразу после ссылки приведен рисунок 28.

Ошибки и опечатки. В тексте диссертации встречаются опечатки (например, «каV.», «стресР», «минуV» – если это минуты, то их принято писать сокращенно – «мин»), несогласованные фразы, грамматические ошибки (С. 16. «Так же» в данном случае и далее по тексту пишется слитно).

Изложенные вопросы и замечания, а также указанные ошибки не влияют на общую высокую оценку диссертационной работы Старикова А.Ю.

Заключение. Диссертационная работа Старикова А.Ю. «Изучение субстратной специфичности десатураз жирных кислот цианобактерий» по теоретическому уровню, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости отвечает критериям ВАК, в том числе Разделу II «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г, а автор работы, Стариков Александр Юрьевич, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки).

Диссертация и отзыв обсуждены на заседании кафедры биохимии и биотехнологии Института Мирового океана (Школы) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» (протокол № 10 от 5 апреля 2023 г.).

Доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры биохимии
и биотехнологии Института
Мирового океана (Школы)
ФГАОУ ВО ДВФУ


Нина Михайловна Санина

Подпись Н.М. Санина
удостоверяю. Начальник
кадрового делопроизводства
ДВФУ
10 " Апр 2023 г.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»
Почтовый адрес ведущей организации:
690922, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10, кампус ДВФУ
Тел.: 8 (423) 265 24 29; 8 (423) 243 34 72, www.dvfu.ru
Адрес электронной почты: rectorat@dvfu.ru