

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Сековой Варвары Юрьевны «Основные физиолого - биохимические и молекулярные аспекты адаптации к стрессовым факторам у дрожжей *Yarrowia lipolytica*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.**

**Актуальность темы.** Исследования стрессов, их источников и механизмов являются чрезвычайно важной задачей современной науки, имеющей очевидное фундаментальное значение и открывающей при этом реальные прикладные перспективы в различных областях человеческой деятельности. Ряд направлений этой научной области - особенно в медицине - достаточно хорошо развиты, а многие из них, связанные с функциями белков и генов, уже детально исследованы. Доказана экономическая эффективность еще более глубокого изучения проблемы стрессов различной этиологии с целью их использования, в том числе в биотехнологии. В этом смысле диссертационная работа Сековой Варвары Юрьевны представляет особый интерес по ряду аспектов.

**Во-первых,** это выбор объекта исследования – *Yarrowia lipolytica* – как репрезентативный пример алкалолотолерантных дрожжей. Это штамм дрожжей дикого типа W29 из коллекции, получивший законные преимущества и предпочтения науки вследствие имеющейся информации по структуре генома (работа коллектива Dujon B., Sherman D. и др, 2004 г). В генно-инженерной биотехнологии имеются перспективы использования *Y.lipolytica*, поскольку секреция белков по ко- транскрипционному принципу создает уникальную привлекательность этого организма как хозяина для экспрессии ряда гетерологичных белков, а система их пост -трансляционной модификации - как перспективного хозяина для экспрессии белков человека и животных в терапевтических целях.

В настоящее время дрожжи *Y. lipolytica* используются как продуцент лимонной кислоты, ферментов липазы и протеазы, а также в качестве высокоэффективного компонента в биоремедиации почвы и воды, утилизации лигноцеллюлозного сырья - в растениеводстве и лесной промышленности. Высокая липолитическая активность создает базу для использования штаммов *Y. lipolytica* для биоконверсии низкокачественных жиров в биодизель, а стойкая галотолерантность - для решения проблемы очистки морской воды от нефтепродуктов.

**Во-вторых,** интерес к работе Сековой В. Ю. связан с выбором собственной экспериментальной модели *Y. lipolytica* W29, полученной культивированием дрожжей в условиях хронического теплового и щелочного стрессов для изучения именно динамических характеристик процессов адаптации, включая показатели антиоксидантного статуса клеток.

Впервые рассмотрены модели изменений гликома, липидома и протеома клеток *Y. lipolytica* W29, вызванных сочетанием моно- и комплексного стрессов, установлено снижение степени ненасыщенности жирных кислот мембранных кардиолипинов при щелочном стрессе, главным образом за счет относительного возрастания маргариновой кислоты. Впервые изучен рост уровней митохондриального белка порина при щелочном и комбинированном стрессах.

Таким образом, можно сказать, что многоплановая работа Сековой В.Ю. посвящена изучению важного биологического объекта, а представленные результаты, бесспорно, обладают значительной **научной новизной**.

В то время как экспериментатору значительно более доступен спектр методических возможностей для изучения структуры биомолекул, анализ их динамических показателей развивается в меньшей степени. Это особенно ценно, когда дело касается неинвазивных методов, не связанных с внесением дополнительных меток в молекулы, как в случае с работой диссертанта.

Полученные в представленной к защите работе Сековой В.Ю. данные являются важными и для биохимии, и для биологической науки, в целом, а

результаты, достигнутые в фундаментальных и прикладных работах с *Y. lipolytica*, имеют большой шанс транслироваться и на других представителях дрожжей и родственных систематических групп.

### **Структура диссертации и автореферата.**

Диссертационная работа Сековой В.Ю. написана по традиционному плану и включает : список сокращений, введение, обзор литературы ( Глава 1), описание использованных объектов и методов (Глава 2), анализ результатов и их обсуждение (Глава 3), заключение, список литературы, который включает 384 источника отечественной и зарубежной литературы. Материал изложен на 214 страницах, содержит 36 рисунков и 9 таблиц. Автореферат соответствует основным положениям и выводам диссертации, содержит список публикаций автора, включая два опубликованных патента, написан понятным языком и хорошо иллюстрирован.

В обзоре литературы дан детальный анализ молекулярно- генетических и физиолого - биохимических механизмов стрессовой устойчивости у грибов, особое внимание обращено на роль митохондрий. Здесь традиционными объектами исследований ранее были дрожжи – сахаромицеты *Saccharomyces cerevisiae* с факультативно-аэробным типом метаболизма, а представитель нестандартных полиэкстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* хотя и изучался, но в меньшем объеме. Это облигатный аэроб, который находит широкое применение как безопасная модель в изучении фундаментальных проблем физиологии дыхания в норме и при кандидомикозах - распространенных и опасных госпитальных инфекциях дыхательных путей, и, конечно, в биотехнологии, как продуцент полезных соединений и модель для анализа геномного разнообразия штаммов на планете Земля. Использование в исследованиях регуляторной роли  $Ca^{2+}$ -зависимого белка наружной мембраны митохондриальной поры порина (VDAC)- это одна из возможностей регуляции метаболических и функциональных процессов клетки путем таргетного воздействия на ее структуру и ферменты матрикса. Совокупность указанных подходов позволяет не только изучить адаптивные

функции клеток, но и стимулировать механизмы адаптации и пластичности в экстремальных условиях жизни и при развитии апоптоза.

### **Научно-практическая значимость работы**

Автором диссертации проделана большая работа по получению и анализу экспериментальных результатов. Комбинированием хронического теплового и щелочного стрессов удалось получить оригинальную экспериментальную модель *Y. lipolytica* W29, провести изучение деталей ультраструктуры клеток и анализ их метаболической перестройки в различных условиях культивирования. Сразу отмечу, что в литературе очень немного работ посвящено исследованию важной проблемы пластичности и резистентности организма к щелочному стрессу, и это придает диссертации особую значимость.

В работе выполнены комплексные сравнительные исследования метаболического ответа культуры *Y. lipolytica* W29 на экстремальные условия культивирования - изменения углеводного спектра цитозоля, липидного состава и протеома клеток, использованы многие новейшие, в том числе уникальные методики. Указанный сравнительный анализ включал оценку окислительно-восстановительного статуса клетки по параметрам активности ферментов антиоксидантного цикла - супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и общего уровня активных форм кислорода АФК. Установлено, в частности, что щелочной стресс на 1/3 увеличивал уровень АФК в клетках, при этом многократно росла активность СОД и вдвое снижалось соотношение GSH/GSSG, за счет падения GSH. При тепловом стрессе также резко возрастала активность СОД. В целом, при комбинированном стрессе все указанные активности ферментов первой линии защиты возрастали на порядки относительно контроля, однако все же они оставались заметно ниже, чем при тепловом монострессе. Сделано заключение, что при комбинировании теплового и щелочного стрессов в *Y. lipolytica* W29 с изменением окислительно-восстановительного статуса клетки развивается эффект перекрестной адаптации, который выражается в

смещении метаболизма в направлении противодействия фактору с максимальным повреждающим эффектом—высокой температуре; специфическая устойчивость к щелочному стрессу характеризуется снижением уровня АФК и увеличением содержания  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого белка - порина внешней мембраны митохондрий (VDAC = voltage-dependent anion channel), а также высоким содержанием маннита- антиоксиданта в цитоплазме при оптимальных условиях культивирования. Последнее, в частности, позволяет рассматривать указанный штамм в качестве реального штамма-продуцента маннита в биотехнологии.

Универсальными защитными белками адаптации клеток *Y. lipolytica* W29 к температурному и щелочному стрессам являются супероксиддисмутаза, тиоредоксин и высокомолекулярные белки теплового шока –шапероны, и это является общим положением для всех ранее изученных биосистем от *E. coli* до млекопитающих и человека.

**В качестве вопросов и замечаний** хотелось бы отметить следующее:

1. Несомненно, полноценный, обзор литературы в работе выиграл бы от краткой информации об обнаружении имеющихся у индуцибельных стрессовых структур микроорганизмов «дополнительных» функций. В частности, таких, как малые белки теплового шока *lbpA* и *lbpB* (12-30 кDa) в *E. coli*, которые являются аналогами домена кристаллина в хрусталике глаза человека и даже регулируют формирование в *E. coli* биопленок антибиотикорезистентности. Равно как и о функциях малых динуклеотидов –алармонов- *Ar<sub>rrrr</sub>A* и *Ar<sub>n</sub>A*, которые долго считались сигналами индукции стрессов, как теплового, так и оксидативного.

2. Хотелось бы также узнать, существуют ли независимые подтверждения такой значительной гетерогенности в росте индуцибельности ферментов адаптации, которые наблюдала автор в своих исследованиях?

Безусловно, указанные вопросы и замечания носят рекомендательный характер и не ставят под сомнения научных положений и выводов автора, не снижают общего положительного впечатления от работы.

**Научные положения и выводы** диссертационной работы Сековой В.Ю. базируются на обширном экспериментальном материале и не противоречат данным литературы в области биохимии и микробиологии. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с привлечением новейших и ряда уникальных методов. Достоверность результатов не вызывает сомнений.

Материалы диссертации были представлены на солидных конференциях, опубликованы в журналах перечня ВАК и международных изданиях с высоким индексом цитирования. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертационной работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Сековой В.Ю. соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, она объединена общей идеей, содержит новые научные результаты и выводы, выдвигаемые для публичной защиты, и свидетельствуют о значительном и важном вкладе результатом в науку.

Диссертационная работа Сековой В.Ю. «Основные физиолого - биохимические и молекулярные аспекты адаптации к стрессовым факторам у дрожжей *Yarrowia lipolytica*» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для биохимии, микробиологии и биотехнологии.

Рецензируемая диссертационная работа по актуальности поставленных целей, новизне результатов и их теоретической и практической значимости удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. и паспорту заявленной специальности 1.5.4. Биохимия, а ее автор **Секова Варвара Юрьевна** заслуживает присвоения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности **1.5.4. Биохимия.**

**Официальный оппонент:**

Доктор биологических наук, зав. лабораторией теоретической генетики Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, главный научный сотрудник, заслуженный деятель науки (по специальности Генетика)

Дата: 15.05.2023

Васильева Светлана Васильевна

Контактные данные: т. +7 (495) 939-72-93, e-mail: svasilieva@chph.ras.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 1.5.7. Генетика.

Адрес места Работы: 119334, Москва, Ленинский проспект, д. 38к3.

Т. +7 (499) 135-78-94, e-mail: ibcp@sky.chph.ras.ru

*«Подпись сотрудника ИБХФ РАН Васильевой С.В.»* заверяю:

Ученый секретарь ИБХФ РАН  
Кандидат биологических наук



Скалацкая С.И.