

«Утверждаю»

Проректор

МГУ имени М.В.Ломоносова

А.А.Федянин

«2» апреля 2023 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» 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. В природных экосистемах микроорганизмы (в том числе мицелиальные и дрожжевые грибы) постоянно подвергаются действию неблагоприятных факторов внешней среды. Способность существовать в экстремальных условиях связано с высоким адаптационным потенциалом грибной клетки. В ответ на действие стрессоров они могут активировать механизмы, запускающие синтез ферментов, а также защитные или сигнальные метаболиты для обеспечения их выживания в этих условиях. Механизмы адаптации привлекают внимание исследователей с точки зрения их роли в реализации биосинтетических способностей клеток. В данной работе для исследования этого были выбраны облигатные аэробные дрожжи *Yarrowia lipolytica*. Эти дрожжи представляют большой интерес, поскольку могут использовать различные субстраты, включая техногенные поллютанты (н-алканы нефтепродуктов, промышленные сточные воды и т. д.) и синтезируют полезные для нас соединения (органические кислоты, ферменты - липазы, цитохром с, L-лактатоксидазу и др.). В связи с этим, актуальность изучения механизмов адаптаций дрожжей *Y. lipolytica* к стрессовым факторам не вызывает сомнений.

Новизна исследования.

Специфическая устойчивость клеток *Y. lipolytica* W29 к щелочному стрессу обеспечивается благодаря комплексу адаптивных реакций: снижению степени ненасыщенности жирных кислот мембранных кардиолипинов за счёт возрастания в составе маргариновой кислоты, высокому цитозольному содержанию маннита – полиола с антиоксидантными свойствами и увеличению содержания порина VDAC во внешней

мембране митохондрий. Адаптация *Y. lipolytica* W29 к повышенной температуре культивирования достигается за счет многократного повышения активности каталазы, накопления в цитозоле цитопротекторного дисахарида трегалозы, изменения состава мембранных липидов за счет замещения стерина на фосфатидилхолин и фосфатидные кислоты при увеличении степени ненасыщенности жирных кислот. Неспецифическими признаками адаптаций к тепловому и щелочному стрессу и их комбинированию у *Y. lipolytica* W29 является мобилизация запасных триацилглицеридов клеток *Y. lipolytica* из липидных капель. При культивировании *Y. lipolytica* в условиях комбинированного стресса наблюдается эффект перекрёстной адаптации, который заключается в смещении метаболизма в сторону противодействия фактору с большим повреждающим эффектом – температуре. При этом возрастает выживаемость клеток и снижается уровень АФК.

Значимость для науки и практики.

Полученные результаты имеют как теоретическое, так и прикладное значение. Выявленные в ходе работы физиолого-биохимические закономерности адаптации *Y. lipolytica* W29 к различным видам стресса расширяют представления об адаптивном потенциале данного организма, в особенности, о способности к адаптации *Y. lipolytica* W29 к хроническому комбинированному стрессу (тепловому и щелочному). Полученное в исследованиях гликома *Y. lipolytica* W29 конститутивно высокое процентное содержание маннита в цитоплазме при оптимальных условиях позволяет рассматривать этот микроорганизм в качестве потенциального штамма-продуцента данного полиола. Индукция промотора гена митохондриального порина VDAC в трансформированной линии *Y. lipolytica* W29 при щелочном и комбинированном стрессовых воздействиях делает перспективным его применение в качестве индуцибельного промотора для синтеза рекомбинантных белков.

Общая характеристика содержания диссертационной работы

Диссертация В.Ю. Сековой построена по классическому плану и состоит из введения, трех глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения»), заключения (выводов), списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа изложена на 215 страницах, содержит 36 рисунков и 9 таблицы. Список литературы включает 384 источника отечественной и зарубежной литературы.

Обзор и анализ литературных источников по теме исследования состоит из нескольких разделов. В первом разделе – наиболее объёмном из них – очень подробно описывается механизм развития и повреждающие факторы эндогенного окислительного стресса, а также основные противостоящие ему механизмы эукариотической клетки.

Далее рассмотрены кратко результаты по влиянию щелочного стресса и охарактеризованы белки теплового шока. В оставшихся разделах описаны цитопротекторные функции углеводных и липидных компонентов, а также роль изменений протеома в защите клеток против стрессовых воздействий.

Применяемые в работе материалы и методы изложены на 18 страницах. В этом разделе приведено детальное описание протоколов различных методов: культивирования, подготовки образцов для наблюдения с помощью просвечивающего электронного микроскопа, методы окрашивания флуорохромами, определения окислительно-восстановительного статуса клеток, а также оценки спектра липидных и углеводных компонентов клетки и протеома. Отдельно описано создание штамма-трансформанта на основе *Y. lipolytica* W29, несущего генетическую конструкцию pUVLT2, включающую ген β -галактозидазы *E.coli* под контролем промотора гена митохондриального порина VDAC (*POR1*). Данная конструкция, встроенная в геном *Y. lipolytica* позволяет оценить уровень индукции промотора *POR1* в оптимальных и стрессовых условиях. Это даёт возможность оценить потенциал *POR1* в качестве стресс-индуцибельного промотора для синтеза рекомбинантных белков.

В целом, по результатам видно, что автором проведена масштабная комплексная экспериментальная работа с использованием различных методов исследования (микробиологических, физиолого-биохимических и молекулярных) на штамме дикого типа дрожжей *Y. lipolytica* W29, полученном из коллекции типовых штаммов CIRM-Levures (Франция). Глава Результаты и обсуждение имеет несколько разделов и каждый раздел имеет заключение, что значительно облегчает оценку полученных данных. Автором показано, что действие щелочного (pH 9) и температурного стресса (38° C) по отдельности и в комбинации вызывают специфические и общие адаптивные ответные реакции. Специфическая устойчивость клеток *Y. lipolytica* W29 к щелочному стрессу обеспечивается благодаря комплексу адаптивных реакций: снижению степени ненасыщенности жирных кислот мембранных кардиолипинов за счёт возрастания в составе маргариновой кислоты, высокому цитозольному содержанию маннита – полиола с антиоксидантными свойствами и увеличению содержания порина VDAC во внешней мембране митохондрий, играющего одну из ведущих ролей в транспорте АФК через внешнюю мембрану митохондрий и определяющего, как предполагается, АФК-зависимый сигналинг в стрессовых условиях Адаптация *Y. lipolytica* W29 к повышенной температуре культивирования достигается за счет многократного повышения активности каталазы, накопления в цитоплазме протекторного дисахарида трегалозы, изменения состава мембранных липидов за счет замещения стерина на фосфатидилхолин и

состава мембранных липидов за счет замещения стерина на фосфатидилхолин и фосфатидные кислоты при увеличении степени ненасыщенности жирных кислот. Неспецифическим признаком адаптаций к тепловому и щелочному стрессу или их комбинации у *Y. lipolytica* W29 является мобилизация запасных триацилглицеридов клеток *Y. lipolytica*. При культивировании *Y. lipolytica* в условиях комбинированного стресса наблюдается эффект перекрёстной адаптации, который заключается в смещении метаболизма в сторону противодействия фактору с большим повреждающим эффектом – температуре. При этом возрастает выживаемость клеток и снижается уровень АФК. Результаты подтверждают в целом консервативную природу адаптаций к действию стрессовых факторов, полученных на других штаммах вида *Y. lipolytica*, а также дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, которые проявляются в поддержании текучести цитоплазматической мембраны, работы антиоксидантной системы, синтеза осмолитов и специфических белков (в том числе белков теплового шока) и др. Автор получил интересные результаты по перекрестной адаптации к щелочному и температурному стрессу практически значимого вида дрожжей *Y. lipolytica*, которые открывают перспективы для использования этой модели в биотехнологии и биоремедиации.

Автореферат и публикации отражают содержание диссертации. Результаты достоверны, проведены с соответствующей математической обработкой, а выводы соответствуют полученным данным.

Замечания и вопросы

Обзор литературы составляет почти половину от содержания диссертационной работы. Его следовало бы сократить за счет первого раздела, посвященного подробному описанию эндогенного окислительного стресса, который возникает как следствие любого стресса и расположить раздел целесообразно после рассмотрения действия экзогенных стрессоров (рН и температуры) на клетки дрожжей.

В разделе Материалы и методы автор описывает приготовление сред с разным значением рН с помощью серной кислоты и щелочи, а не буферных растворов, хотя известно, что в процессе культивирования грибы выделяют различные метаболиты, которые могут изменять значения рН среды роста.

Требуется пояснения, используемые автором термины «хронического и острого стресса» применительно к условиям эксперимента.

Следует отметить невысокое качество фотографий, приведенных в работе, что затрудняет идентификацию ультраструктуры клеток дрожжей (рис. 14) и вызывает

сомнение формирование комплекса ядро + липидное вкрапление + митохондрия. В учебной и научной литературе принято использовать термин «липидное включение». Возникает и вопрос о присутствии пероксисом, которые являются обязательной органеллой клетки грибов, в особенности при действии стрессовых факторов, так как в них преимущественно синтезируются ферменты антиоксидантной защиты (каталазы, пероксидазы).

Возрастание выживаемости клеток *Y. lipolytica* W29 при одновременном действии двух стрессовых факторов (реакции среды и температуры), а не усиление или сохранении на уровне наиболее сильного температурного стресса требует, видимо, более глубокого изучения и объяснения.

Требуется пояснения вопрос к определению размеров клеток дрожжей *Y. lipolytica*, автор отмечает уменьшение размеров клеток под действием стресса примерно в 1,5-2 раза по сравнению с контролем. Как оценивали этот параметр у клеток в контрольном эксперименте и в условиях стресса? Проводили подсчет по фотографиям, полученным с помощью светового микроскопа, или по размеру профилей клеток на электронно-микроскопических срезах? Есть ли статистика к полученным результатам?

Из мелких замечаний – в тексте работы допущено много грамматических ошибок (пропущенные буквы, неправильное написание слов и др.), неполный список сокращений, в ряде случаев необходима редакция текста, без лишних слов и с более ясным выражением мысли. Иногда сложно читать, так как в предложении до 3-х сокращений терминов.

Заключение

Диссертационная работа Сековой Варвары Юрьевны «Основные физиолого-биохимические и молекулярные аспекты адаптации к стрессовым факторам у дрожжей *Yarrowia lipolytica*», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия», является законченным научным исследованием, посвященным изучению основных физиолого-биохимических закономерностей и молекулярных механизмов развития адаптивного ответа экстремофильных дрожжей *Y. lipolytica* W29 на внешние стрессоры (рН и температуру культивирования). Содержание диссертации в полной мере соответствует специальности 1.5.4 – «Биохимия», содержание автореферата соответствует содержанию диссертации. Выводы обоснованы и соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

В целом, представленная на рассмотрение диссертационная работа В.Ю. Сековой по своей актуальности, научной новизне и практической значимости, полноте описания и достоверности полученных результатов полностью соответствует всем требованиям

«Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями, внесенными Постановлениями Правительства РФ от: 21.04.2016 № 335; 02.08.2016 № 748; 29.05.2017 № 650; 20.03.2021 № 426; 11.09.2021 № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Варвара Юрьевна Секова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры микологии и альгологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, протокол заседания №15 от 23 мая 2023 года (за 14, против нет, воздержался 1 человек).

Профессор кафедры микологии и альгологии
Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
Доктор биологических наук



О.В.Камзолкина

Заведующий кафедрой микологии и альгологии
Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
доктор биологических наук



А.В. Кураков

