

«Утверждаю»

Проректор

МГУ имени М.В.Ломоносова

А.А.Федягин



«20» апреля 2023 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» на докторскую работу Сековой Варвары Юрьевны «Основные физиологические и биохимические 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

мемbrane 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 стеринов на фосфатидилхолин и фосфатидные кислоты при увеличении степени ненасыщенности жирных кислот. Неспецифическими признаками адаптаций к тепловому и щелочному стрессу и их комбинированнию у *Y. lipolytica* W29 является мобилизация запасных триацилглицеридов клеток *Y. lipolytica* из липидных капель. При культивировании *Y. lipolytica* в условиях комбинированного стресса наблюдается эффект перекрестной 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 гликогена *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 таблиц. 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° С) 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 мемbrane 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 стеринов на фосфатидилхолин и

состава мембранных липидов за счет замещения стеринов 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 перекрестной 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 сохранение на уровне наиболее сильного температурного стресса требует, видимо, более глубокого изучения и объяснения.

Требует 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 физиологобиохимические 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 №14 от 25 апреля 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

25.04.2023г.

А.В. Кураков