

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК,
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 15 июня 2023 г., протокол № 15 о присуждении Сековой Варваре Юрьевне, гражданство Российская Федерация, ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимии

Диссертация «Основные физиолого-биохимические и молекулярные аспекты адаптации к стрессовым факторам у дрожжей *Yarrowia lipolytica*» по специальности 1.5.4 Биохимия принята к защите 13.04.2023 г. (протокол № 11) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк, от 10 февраля 2014 года № 55/нк и от 30.09.2015 №1166/нк и 13 марта 2019 года № 222/нк), и от 22.03.2023 №501/нк.

Соискатель Секова Варвара Юрьевна (1988 года рождения) в июле 2011 г. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» по специальности «Биотехнология». В ноябре 2012 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, где проходила обучение по октябрь 2016 г. С мая 2012 г. по ноябрь 2021 г. работала в лаборатории Экологической и эволюционной биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, вошедшего в состав ФИЦ «Биотехнологии Российской академии наук». С 2022 г. и по настоящее время работает в ООО «ДельрусКом».

Диссертационную работу соискатель Секова В.Ю. выполняла в лаборатории Экологической и эволюционной биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель:

Дерябина Юлия Ивановна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией экологической и эволюционной биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Официальные оппоненты:

Васильева Светлана Васильевна, доктор биологических наук, зав. Лаборатории теоретической генетики, Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, главный научный сотрудник, заслуженный деятель науки;

Аринбасарова Анна Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Лаборатория адаптации микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН), обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Выбор официальных оппонентов был обусловлен: тем, что доктор биологических наук, Васильева Светлана Васильевна является одним из ведущих отечественных специалистов в области молекулярно-биологических механизмов адаптации клеток к окислительному стрессу; тем, что кандидат биологических наук, Аринбасарова Анна Юрьевна является одним из ведущих отечественных специалистов по дрожжам вида *Yarrowia lipolytica*;

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах. Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Сековой Варвары Юрьевны.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова или МГУ) в своем положительном отзыве, подписанном доктором биологических наук, доцентом Международного биотехнологического центра МГУ по кафедре

биологии почв, заведующим кафедрой микологии и альгологии на биологическом факультете МГУ Кураковым Александром Васильевичем и утвержденном проректором МГУ имени М.В. Ломоносова доктором физико-математических наук, профессором Федяниным Андреем Анатольевичем, указала, что диссертационная работа Сековой Варвары Юрьевны является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор, Секова Варвара Юрьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности – 1.5. 4 Биохимия. Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что в МГУ имени М.В. Ломоносова активно ведутся исследования в области изучения ответов эукариотических клеток на стресс. Таким образом, сотрудники МГУ имени М.В. Ломоносова и, в частности, кафедры микологии и альгологии, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Сековой Варвары Юрьевны. В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации:

Секова В. Ю., Исакова Е. П., Дерябина Ю. И. Применение экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в биотехнологии (обзор) //Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – №. 3. – С. 290-290.

2. Секова, В. Ю., Гесслер, Н. Н., Исакова, Е. П., Антипов, А. Н., Дергачева, Д. И., Дерябина, Ю. И., и Трубникова, Е. В. Окислительно-восстановительный статус экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* при адаптации к рН-стрессу //Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – №. 6. – С. 570-570.

3. Куланбаева, Ф. Ф., Секова, В. Ю., Исакова, Е. П., Дерябина, Ю. И., и Николаев, А. В. Новый эффективный промотор гена митохондриального потенциалзависимого порина VDAC в геноме дрожжей *Yarrowia lipolytica* //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение " Российская академия наук", – 2016. – Т. 470. – №. 4. – С. 475-478.

4. Секова, В. Ю., Дергачева, Д. И., Терешина, В. М., Исакова, Е. П., и Дерябина, Ю. И. Углеводный спектр экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в условиях рН-стресса //Микробиология. – 2018. – Т. 87. – №. 2. – С. 125-135.

5. Sekova, V. Y., Dergacheva, D. I., Isakova, E. P., Gessler, N. N., Tereshina, V. M., Deryabina, Y. I. Soluble sugar and lipid readjustments in the *Yarrowia lipolytica* yeast at various temperatures and pH //Metabolites. – 2019. – Т. 9. – №. 12. – С. 307.

6. Sekova, V. Y., Kovalyov, L. I., Kovalyova, M. A., Gessler, N. N., Danilova, M. A., Isakova, E. P., & Deryabina, Y. I. Proteomics Readjustment of the *Yarrowia lipolytica* Yeast in Response to Increased Temperature and Alkaline Stress //Microorganisms. – 2021. – Т. 9. – №. 12. – С. 2619.

Yarrowia lipolytica yeast //FEBS OPEN BIO. – 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY, 2019. – Т. 9. – С. 171-172.

Результаты работы также были представлены на 14 международных и всероссийских конференциях.

На диссертацию поступили отзывы:

Официального оппонента д.б.н. **Васильевой С.В.** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

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 кДа) 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 — алярмонов – *ArpppA* и *ArpA*, 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?

Официального оппонента к.б.н. **Аринбасаровой А.Ю.** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1) В главе 3.1.1. Параметры роста культуры *Yarrowia lipolytica* - Динамика накопления биомассы представлена некорректно: накопление биомассы определялось только по оптической плотности при длине волны, равной 590 нм (OP_{590}). OP_{590} — это мутность, показывающая количество частиц в единице объема. Этот параметр не учитывает слипание клеток (агглютинацию), которая зависит от концентрации клеток, pH, температуры и т.д. Должны быть представлены результаты определения весовых характеристик собственно биомассы. например, по сухому весу, что позволяет более адекватно представить процесс роста.

2) Отсутствуют данные роста клеток в логарифмических координатах, без которых очень проблематично правильно определить (разграничить) фазы роста клеток (логарифмическую, стационарную и т.д.).

3) Результаты, представленные на рис. 2 (щелочные условия), предполагают двухфазный рост? (2 лаг-фазы, 2 лог- фазы...). Автором пропущено это явление, которое является важным физиологическим аспектом приспособления микроорганизма к неблагоприятным условиям внешней среды, включающим, например, индукцию определенных ферментов.

4) Глава 3.2. Что касается анализа дыхательной активности клеток, то, следовало бы более детально описать вклад альтернативной оксидазы в общее потребление кислорода клетками. Общее дыхание клеток не является просто суммой переноса электронов по основному и альтернативному пути.

5) В главу «Объект и методы исследования» автор забыл включить раздел «Статистическая обработка данных».

б) Замечания по формулировке выводов:

Вывод 1. Что подразумевается под «долгосрочном действием» условий?

Вывод 3. Что значит «Специфическая устойчивость»? Уточнить: что подразумевается под «регуляцией окислительного фосфорилирования»? Изменялось ли изменение содержания АТФ в клетке?

Вывод 5. Эффект перекрёстной адаптации — это не смещение метаболизма в сторону противодействия какому - либо фактору.

Вывод 6. В чем универсальность указанных цитопротекторных белков в контексте данной работы? Имеет место только при адаптации клеток *Y. lipolytica* W 29 Что известно про другие штаммы *Y. lipolytica* W 29? Что известно про другие дрожжи? Имеет Место только при адаптации клеток к исследованным стрессовым воздействиям?

7) Следует отметить присутствие в тексте достаточное количество неточностей, стилистических ошибок и опечаток:

- «Реакция на стресс». Стресс — это реакция организма на неблагоприятные

Факторы.

-... были построены «кривые роста»...

- Использование термина «культура» в данном контексте некорректно, так как в работе используется один штамм.

- не совсем обосновано и часто используются термины «удобная модель», «уникальность», «универсальность».

Вопрос: В качестве объекта исследования использовали штамм *Y. lipolytica W 29* (дикий тип), полученный из коллекции CIRM-Levurescollection (Франция). Надо обосновать - На каком основании был выбран именно этот штамм, какие у него особенности?

Ведущей организации – МГУ им. М.В. Ломоносова (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. 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.
2. 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.
3. Требуется пояснения, используемые автором термины «хронического и острого стресса» применительно к условиям эксперимента.
4. Следует отметить невысокое качество фотографий, приведенных в работе, что затрудняет идентификацию ультраструктуры клеток дрожжей (рис. 14) и вызывает сомнение формирование комплекса ядро + липидное включение + митохондрия. В учебной и научной литературе принято использовать термин «липидное включение».
5. 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).
6. Возрастание выживаемости клеток штамм *Y. lipolytica W 29* 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.
7. 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 помощью светового микроскопа, или по размеру профилей клеток на электронно-микроскопических срезах? Есть ли статистика к полученным результатам?

8. 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.

На автореферат поступили отзывы:

д.б.н., профессора кафедры биохимии кафедры биохимии и биофизики ФГБОУ ВО Дагестанский государственный университет» Кличханова Н.К., замечаний нет.

д.б.н., профессора кафедры общей биологии и экологии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» Лукаткина А.С., замечаний нет.

д.б.н., профессора, декана медико-биологического факультета, заведующего кафедрой медицинской биохимии и микробиологии ФГБЦУ ВО «Воронежский государственный университет» Поповой Т.Н., замечаний нет.

Вопросы задавали:

проф. д.х.н. Бовин Н.В.,
проф. д.х.н. Дзантиев Б.Б.,
проф., д.б.н. Крицкий М.С.,
д.б.н. Марданов А.В.,
д.б.н. Топунов А.Ф.,
д.б.н. Федоров А.Н.,
проф., д.б.н. Шишкин С.С.,
проф., д.б.н. Шумянцева В.В.

В дискуссии участвовали:

д.б.н. Ковалёв Л.И.,
д.б.н. Топунов А.Ф.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

В работе впервые получена экспериментальная модель культивирования *Y. lipolytica* W29 при комбинировании хронического теплового и щелочного стрессоров. Впервые показаны различия антиоксидантного статуса клеток *Y. lipolytica* W29 при культивировании в оптимальных и щелочных условиях, в условиях теплового стресса, а также при комбинировании теплового и

щелочного стрессоров. Показано, что тепловое воздействие приводит к наиболее выраженному вовлечению антиоксидантных механизмов клеточной защиты. Впервые предложены концептуальные схемы изменений метаболизма углеводов и липидов клеток *Y. lipolytica* W29 при оптимальной температуре, а также при тепловом стрессовом воздействии. Впервые продемонстрировано снижение степени ненасыщенности жирных кислот мембранных кардиолипидов при щелочном стрессе за счёт возрастания в их составе маргариновой кислоты. Впервые показано расходование запасных триацилглицеридов клеток *Y. lipolytica* W29 из липидных капель в условиях теплового и щелочного стрессов и при их комбинировании. Впервые проанализированы изменения протеома клеток *Y. lipolytica* W29 при тепловом и комбинированном стрессовых воздействиях. Впервые показана способность к перекрёстной адаптации между тепловым и щелочным стрессорами для *Y. lipolytica*. Впервые продемонстрировано увеличение экспрессии митохондриального порина в условиях щелочного стресса, а также при комбинировании щелочного и окислительного стрессоров.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

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 спектра липидов *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.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад диссертанта

Личный вклад диссертанта заключался в проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

Заключение

Диссертационную работу Сековой Варвары Юрьевны «Основные физиолого-биохимические и молекулярные аспекты адаптации к стрессовым факторам у дрожжей *Yarrowia lipolytica*» можно считать законченным научно-квалификационным исследованием.

Диссертант представил четкую и логичную структуру работы, которая соответствует ее теме и цели. Автор обладает глубокими знаниями в области своей специализации и проделал большую работу по изучению предшествующих исследований, что позволило ему точно оценить текущее состояние проблемы. В диссертации использованы различные методы исследования, которые были правильно выбраны и применены для достижения поставленных целей. Результаты исследований, представленные в работе, оригинальны и имеют практическую значимость. Выводы, сделанные в диссертации, полностью соответствуют ее целям и задачам.

На заседании 15 июня 2023 г. диссертационный совет принял решение присудить Сековой Варваре Юрьевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Из 26 членов Диссертационного совета на заседании присутствовали 21 человек. Из них 7 докторов химических наук, 13 докторов биологических наук.

«За» присуждение ученой степени – 20;

«Против» – 1;

Воздержались – нет.

Заместитель председателя диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

Доктор химических наук, профессор



Б.Б. Дзантиев.

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

Кандидат биологических наук

«15» июня 2023 г.



А.Ф. Орловский