

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой
степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 20 февраля 2019 № 2

О присуждении **Поваровой Наталье Владимировне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Катализ образования кремнезема рекомбинантными силикатеинами, катепсинами и их мутантными вариантами» по специальности 03.01.03 (молекулярная биология) принята к защите 19 декабря 2018 г., протокол №17 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, (117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15 февраля 2013 года.

Соискатель Поварова Наталья Владимировна 1989 года рождения, в 2011 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова по специальности "Биохимия".

С 2011 года по 2015 гг. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории биофотоники ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории биофотоники ИБХ РАН.

Научный руководитель - доктор биологических наук, член-корреспондент РАН Лукьянов Константин Анатольевич, заведующий лабораторией биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Вейко Владимир Петрович - доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН ФИЦ Биотехнологии РАН

Митькевич Владимир Александрович - кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Московская область, г. Долгопрудный, в своем положительном заключении, подписанном д.х.н., доцентом Чупиным Владимиром Викторовичем, утвержденном к.ф.-м.н. Баганом Виталием Анатольевичем, проректором по научной работе и программам развития Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», отметила, что автор предложил два новых кремнийсодержащих субстрата для исследований силикатеинов, получил более активные мутантные варианты силикатеинов и катепсинов, и указала, что диссертационная работа Поваровой Натальи Владимировны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 6 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 3 работы общим объемом 1,5 печатный лист в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Н.В. Поварова внесла основной вклад:

1. Н.В. Поварова, М.С. Баранов, С.Н. Ковальчук, И.В. Семилетова, К.А. Лукьянов, В.Б. Кожемяко. Новый водорастворимый субстрат для силикатеинов. *Биоорганическая химия* 2015, 41, 380–382. doi:10.7868/S0132342315030070

2. Povarova N.V., Markina N.M., Baranov M.S., Barinov N.A., Klinov D.V., Kozhemyako V.B., Lukyanov K.A. A water-soluble precursor for efficient silica polymerization by silicateins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018, 495, 2066-2070. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.075.

3. Povarova N.V., Barinov N.A., Baranov M.S., Markina N.M., Varizhuk A.M., Pozmogova G.E., Klinov D.V., Kozhemyako V.B., Lukyanov K.A. Efficient silica synthesis from tetra(glycerol)orthosilicate with cathepsin- and silicatein-like proteins. *Scientific Reports* 2018, 8:16759. doi: 10.1038/s41598-018-34965-9.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н., проф., Вейко Владимира Петровича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. В разделе Материалы и методы отсутствует список реагентов. 2. Излишне подробно описаны условия проведения электрофореза фрагментов ДНК и денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. 3. Синтез субстратов приведен без ссылок на ранее разработанный другими авторами метод получения. Не приведены характеристики веществ. 4. Вместо термина «ген» при описании получения экспрессионных векторов, следовало использовать термин «кодирующая последовательность». 5. Не обосновано преимущество выбора именно вектора рЕТ40(b+). 6. Не приведены общие структуры полученных экспрессионных векторов. В приведенных первичных структурах рекомбинантных белков не указаны стартовый аминокислотный остаток (метионин), и исчез His-Tag. 7. Было бы крайне полезным оценить протеолитические свойства исследованных белков. Эта характеристика позволила бы оценить правильность фолдинга как исходного белка, так и его мутантных форм. 8. В подразделе Анализ цитотоксичности автор не обосновывает выбор именно культуры эукариотических клеток линии HeLa Kyoto. 9. В подразделе Выделение и очистка белков (стр. 46) диссертант описывает условия элюции белка и указывает время хранения препарата – 3 дня. Возникают вопросы: при какой температуре хранился раствор?

Что происходило с данным белком через три дня? Почему нельзя было перевести белок сразу в требуемый буферный раствор(-ы)? Нельзя ли данный фермент лиофилизировать из подходящего буфера и использовать в дальнейшем? 10. Дополнительно необходимо отметить, что ТГЭОС ранее использовался при различных исследованиях (Hoffman et al., 2002; Shchipunov Y.A., 2003), в том числе и связанных с изучением свойств силикатеинов (Shkryl Y.N., 2016; Каменев Д.Г., диссерт. работа, 2015). 11. Не приведено объяснение повышению активности силикатеина А1 при 25°С. На рисунке 39 ТГС непонятно, почему ТГС устойчив к воздействию кислого рН.

Отзыв официального оппонента к.х.н. Митькевича Владимира Александровича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Не указан источник клеток HeLa, используемых в работе. 2. Каким образом оценивалась выживаемость клеток? Следовало указать прибор, на котором проводились измерения, длины волн и т.д. 3. На стр. 67 сделано сравнение силикатеинов А1 и α . При этом сделан вывод, что активность фермента зависит от поверхностного заряда. Из приведенных данных такой вывод сделать было еще нельзя. На мой взгляд, этот вывод следовало перенести в конец работы, где уже подробно описано влияние замен поверхностных остатков в силикатеине на его активность. 4. Автор несколько раз выбирает тетраглицерол ортосиликат в качестве наилучшего субстрата (стр. 59 и 69). Достаточно было один раз это указать.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. В диссертации присутствуют некоторые опечатки и жаргонизмы. 2. В разделе «Материалы и методы» прекрасно описаны методы исследований, но практически нет сведений о материалах. 3. В работе отсутствуют эксперименты с силикатом натрия, который является природным субстратом. Также нет данных по олигомеризации силикатеинов, хотя известно, что в природе они собираются в филаменты. 4. На рис.51 стоило бы показать результаты деконволюционного анализа спектров КД. Так можно оценить, насколько успешно проведена деконволюция.

Отзыв на автореферат кандидата биологических наук младшего научного сотрудника лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН **Путляевой Лидии Викторовны**. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Отзыв на автореферат кандидата биологических наук научного сотрудника Института Макса Планка Max Planck Institute of Immunology and Epigenetics, Freiburg, Germany. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, связанных с исследованиями функционирования белков, ферментативного катализа и получения наноматериалов, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих научных российских и международных журналах. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской и экспертной работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработана новая экспериментальная методика для изучения полимеризации кремнезема в присутствии силикатеинов и катепсинов, позволившая впервые обнаружить полимеризацию кремнезема катепсином L человека. Предложены 2 новых субстрата, которые позволяют эффективно полимеризовать кремнезем *in vitro*. Получены и изучены свойства мутантных вариантов силикатеинов и катепсинов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что опровергнуто представление о том, что остатки каталитической триады Ser-His-Asn играют существенную роль в полимеризации кремнезема. Автор обнаружил противоречие между существующей гипотезой о механизме работы силикатеинов и экспериментальными данными. Для изучения свойств мутантных вариантов белков в работе эффективно использованы модифицированные экспериментальные методики получения аморфного кремнезема и определения концентрации силикатов в растворе.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что определены оптимальные условия для полимеризации кремнезема в присутствии силикатеина и тетраглицерол ортосиликата, получены более активные варианты силикатеинов и катепсинов. Показана возможность использования катепсина L человека для получения кремнезема *in vitro*.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные данные получены с использованием сертифицированного оборудования, приведены данные калибровок, показана воспроизводимость результатов в различных условиях. Данные получены альтернативными методами в независимых экспериментах.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании, выполнении и анализе результатов экспериментов. Все экспериментальные данные получены автором лично, за исключением спектров кругового дихроизма белков (получены совместно с лабораторией искусственного антителогенеза ФНКЦ ФХМ) и микрофотографий частиц кремнезема (получены совместно с лабораторией медицинских нанотехнологий ФНКЦ ФХМ). Автор лично представлял результаты работы на международных конференциях, принимал активное участие в подготовке и продвижении научных публикаций.

На заседании 20 февраля 2019 диссертационный совет принял решение присудить Поваровой Наталье Владимировне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 5 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 03.01.03 - молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, человек, проголосовали: за 21, против 0, недействительных бюллетеней 1.

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета



академик РАН Иванов В.Т.

д.ф.-м.н. Олейников В.А.