

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе и
программам развития
федерального государственного
автономного образовательного
учреждения высшего образования
«Московский физико-технический
институт (государственный
университет)»



Баган Виталий
Анатольевич

2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию **Поваровой Натальи Владимировны**
**«Катализ образования кремнезема рекомбинантными силикатеинами,
катепсинами и их мутантными вариантами»**,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 - «молекулярная биология»

Актуальность диссертационной работы

Ферментативный синтез частиц кремнезема происходит в мягких условиях и не требует высоких температуры и давления. Полученные материалы обладают различными оптическими и механическими свойствами, что делает ферментативное получение частиц кремнезема привлекательной стратегией синтеза.

В природе активная полимеризация кремнезема характерна для диатомовых водорослей и кремниевых губок. Основными белками, вовлеченными в полимеризацию кремневыми губками, являются силикатеины- группа катепсин-подобных протеаз. В настоящее время исследуется возможность применения материалов, полученных с помощью силикатеинов разных кремниевых губок, в регенеративной медицине и для синтеза полупроводников.

Несмотря на активные попытки практического применения силикатеинов, очень мало известно о механизме их каталитической активности. Отчасти это связано с плохорастворимым субстратом тетраэтил ортосиликатом, который образует эмульсию, что затрудняет исследование взаимодействия с белком. Кроме того, многие силикатеины плохо экспрессируются, что также усложняет изучение каталитической активности белка.

В своей работе Поварова Н.В. поставила целью исследовать биохимические особенности силикатеинов и родственных белков в контексте их перспективного использования для ферментативного образования кремнезема *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна диссертационной работы

Для достижения цели автор сформулировал задачи, которые можно разделить на прикладные – подбор субстрата для работы с силикатеином, подбор условий для экспрессии и выделения силикатеина, и определение оптимальных условий для полимеризации кремнезема, и теоретические, которые включают мутационный анализ силикатеинов и родственных белков для установления роли различных остатков в катализе.

Предложенный автором субстрат – тетраглицерол ортосиликат (ТГС) – оказался удобным соединением для работы с силикатеинами. ТГС хорошо растворяется в воде и в его присутствии эффективно образуются частицы

кремнезема. Кроме того, новый субстрат обладает сниженной токсичностью относительно других субстратов силикатеинов.

Поварова Н.В. подобрала условия для экспрессии и выделения силикатеина A1 обыкновенной губки *Latrunculia oparinae* в бактериальной системе. Белок выделялся из растворимой фракции бактериального лизата без добавления массивных меток, в отличие от силикатеинов других губок.

В ходе дальнейшей работы были определены оптимальные условия для ферментативного образования кремнезема в присутствии ТГС, такие как концентрация белка и субстрата, продолжительность реакции, рН, температура и присутствие восстанавливающих агентов. При исследовании кинетики образования кремнезема Поварова Н.В. обнаружила, что частицы становятся значительно прочнее со временем даже без участия белка.

Во второй части работы автор исследовала 3 белка – силикатеин и катепсин L губки *L. oparinae*, а также катепсин L человека. Указанные белки демонстрируют 65% гомологии, но при этом белки губки способны полимеризовать кремнезем, а для катепсина L человека такой активности показано не было.

Выбор позиций мутагенеза основывался на предполагаемом механизме конденсации кремнезема. По данным литературы в конденсацию кремнезема вовлечены остатки каталитической триады – 25S, 163H и 187N, а также остатки в положениях 23-26, фланкирующие каталитический 25S. Поварова Н.В. сделала для всех белков две группы мутантных вариантов. В первой группе остатки, характерные для силикатеина, заменяли на остатки, характерные для катепсина L, и наоборот. Во второй группе мутантных вариантов белков аминокислотные остатки заменяли на аланин.

Все полученные мутантные варианты были способны полимеризовать кремнезем в присутствии ТГС. Бычий сывороточный альбумин и флуоресцентный белок mKate, использованные в качестве контроля, силикатеиновой активности не продемонстрировали. Таким образом было

продемонстрировано, что данные остатки являются необходимыми для катализа полимеризации кремнезема.

Ранее остатки – 25S, 163H и 187N считали каталитическими для реакции полимеризации кремнезема на основе высокой гомологии между силикатеинами и катепсинами L. И действительно, неоднократно было продемонстрировано, что эти остатки являются критическими для гидролиза различных соединений силикатеинами. Но благодаря предложенному в работе субстрату ТГС, который обладает более высокой скоростью самопроизвольного гидролиза, чем ранее используемые субстраты силикатеина, удалось обнаружить, что в полимеризации кремнезема остатки каталитической триады участия не принимают.

В работе впервые показана возможность полимеризации кремнезема катепсином L человека. Этот результат позволяет предположить, что и другие белки могут быть использованы для получения частиц кремнезема с различными свойствами.

При анализе силикатеиновой активности мутантных вариантов белков автор обнаружила варианты силикатеина и катепсина, обладающие в три раза большей активностью, чем соответствующие белки дикого типа. Эти варианты белков можно использовать для более эффективного синтеза частиц кремнезема. Возможно, что и конденсацию других соединений эти варианты могут осуществлять более эффективно.

Полученные результаты показывают, что существующее представление о механизме полимеризации кремнезема силикатеинами, неверно. Но тем не менее мутантные варианты, полученные в работе, демонстрируют разную активность. Поварова Н.В. предполагает, что эффект от мутаций связан с изменением пространственной структуры белка. Это предположение проверено с помощью спектров кругового дихроизма. Введенные мутации действительно сильно влияют на вторичную структуру белка. Однако для утверждения, что именно этот эффект является ключевым для полимеризации кремнезема, пока недостаточно экспериментальных данных.

Практическая значимость работы

Материалы, полученные с использованием силикатеинов, применяют в различных областях, таких как регенеративная медицина и синтез полупроводников. Понимание механизма работы силикатеина и родственных белков позволит лучше контролировать свойства получаемых материалов. Получение частиц кремнезема с помощью катепсинов открывает возможности для синтеза материалов с новыми свойствами.

Достоверность и ценность результатов диссертационной работы

Оценка достоверности полученных результатов показала, что диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом и практическом уровне с применением различных молекулярно-биологических и биохимических методов. Воспроизводимость результатов и корректность их обработки подтверждаются использованием альтернативных методов исследования. Все измерения в работе выполнены многократно, с постановкой необходимых контрольных экспериментов. Определена статистическая значимость различий полученных результатов.

Основное содержание диссертационной работы

Работа написана по классическому плану, изложена на 92 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 85 ссылок. Работа содержит 5 таблиц и 51 рисунок.

Обзор литературы написан четко и лаконично, и охватывает такие аспекты, как формирование кремнеземных спикул *in vivo* и *in vitro*. Автор подробно описывает эксперименты по получению частиц кремнезема в присутствии силикатеина, а также синтетических аналогов силикатеинов. В конце раздела также рассмотрено образование не кремниевых частиц с помощью силикатеинов и описан предполагаемый механизм катализа таких реакций.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные в работе методы. В разделе «Результаты и обсуждения» Поваровой Н.В. четко и убедительно описаны результаты проведенных экспериментов и приведена их интерпретация. Основные результаты и выводы адекватно отражают проделанную работу.

Соответствие содержания и автореферата диссертации

Автореферат полностью и точно отражает содержание диссертации.

Замечания по диссертационной работе

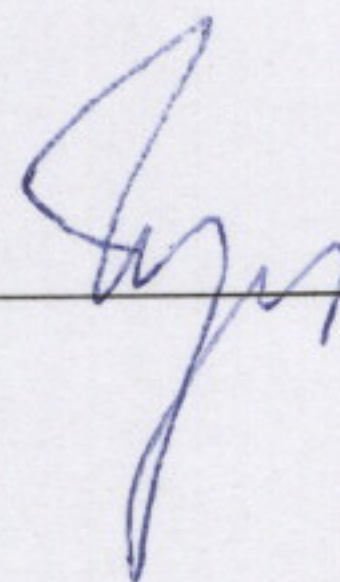
1. В диссертации присутствуют некоторые опечатки и жаргонизмы. Например, «спектры пустого буфера», стр.48.
2. В разделе «Материалы и методы» прекрасно описаны методы исследований, но практически нет сведений о материалах.
3. В работе отсутствуют эксперименты с силикатом натрия, который является природным субстратом. Также нет данных по олигомеризации силикатеинов, хотя известно, что они собтраются в филаменты сложным образом.
4. На рис.51 стоило бы показать результаты деконволюционного анализа спектров КД. Например, точками. Тогда было бы понятно насколько успешно проведена деконволюция.

Указанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертации Поваровой Натальи Владимировны «Катализ образования кремнезема рекомбинантными силикатеинами, катепсинами и их мутантными вариантами».

Заключение по диссертации Поваровой Н.В.

Диссертационная работа Поваровой Натальи Владимировны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а сам диссертант несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

Отзыв на диссертацию обсуждён и одобрен на расширенном заседании кафедры биофизики МФТИ «15» января 2019 г., протокол № 8.



Чупин Владимир Викторович

Доктор химических наук (специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ), доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Физтех-школа фундаментальной и прикладной физики, кафедра биофизики, заведующий
адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9,
тел.: +7 926 878 0023,
e-mail: vvchupin@gmail.com,
web-сайт: <https://mipt.ru/>