

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию **Поваровой Натальи Владимировны** на тему **«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 темы выполнения работы

Диссертационная работа Поваровой Н.В. посвящена определению биохимических особенностей функционирования силикатеинов и родственных им белков. Силикатеины, относящиеся к группе катепсин-подобных белков, способны полимеризовать кремнезем в водных растворах при нейтральных значениях pH. Предполагается, что эти ферменты могут быть использованы для образования кремнезема как в системах *in vitro*, так и *in vivo*. Этим и определяется актуальность исследования Поваровой Н.В., поскольку наноматериалы из диоксида кремния находят все более широкое применение в различных отраслях науки и техники, включая получение пленок с определенными свойствами и наночастиц для адресной доставки лекарственных средств. Синтез наноматериалов с использованием ферментов протекает в достаточно мягких по сравнению с химическим синтезом условиях, а сами материалы, полученные в биологических системах, демонстрируют необычные физико-химические свойства. Несмотря на то, что силикатеины были идентифицированы в качестве основных участников полимеризации кремнезема губками более 20 лет назад, молекулярный механизм их каталитического действия до сих пор не ясен. Кроме этого не были разработаны эффективные субстраты для силикатеинов. В тоже время, выявление механизмов, обеспечивающих образование частиц кремнезема, необходимо для направленного синтеза наноматериалов на его основе. Автором предложены два новых водорастворимых субстрата для силикатеинов – тетраакис(гидроксиэтил) ортосиликат и тетраглицерол ортосиликат, которые активно полимеризуются силикатеином А1 и проявляют низкую токсичность по отношению к клеткам млекопитающих. Кроме того, с помощью точечного мутагенеза выявлены детали молекулярного механизма полимеризации кремнезема

силикатеинами. Все полученные данные являются новыми и актуальными для развития биохимии силикатеинов и их применения в производстве наноматериалов.

Структура и объем диссертации

Диссертация Поваровой Н.В. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, описания полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 92 страницах, содержит 51 рисунок и 5 таблиц. Список цитируемой литературы включает 85 источников.

Во Введении автор описывает степень разработанности области исследования, аргументирует актуальность темы, формулирует цель работы, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов.

В Обзоре литературы, занимающем 30 страниц, изложены основные сведения о формировании спикул губок, являющихся их минеральным скелетом, с помощью силикатеинов. Рассмотрены вопросы формирования и роста спикул. Значительное внимание уделено сборке силикатеиновых филаментов, являющихся органической основой спикул. Отдельно рассмотрен вопрос конденсации кремнезема силикатеинами и предполагаемые на сегодняшний день механизмы этого процесса. Материал обзора представлен в доступной для широкого круга читателей манере, лаконичность изложения сочетается с четкой логикой и ясными формулировками.

Раздел Материалы и методы, изложенный на 16 страницах, включает большой набор молекулярно-биологических, биохимических и биофизических методов, которые автор использовал в ходе работы. Методы описаны достаточно подробно, для их возможного воспроизведения. Этот раздел демонстрирует широкий набор экспериментальных навыков диссертанта и показывает его высокую квалификацию в работе руками.

Раздел Результаты и обсуждение является основным и занимает 30 страниц. В нем достаточно подробно изложены и обсуждены разработанные подходы и полученные результаты, проанализированы и обсуждены сделанные наблюдения, их следствия и возможное применение. Раздел содержит большое количество иллюстраций, существенно облегчающих понимание представленного материала. Надо отметить, что автор, с одной стороны, сообщает все необходимые сведения, не

прибегая к чрезмерному упрощению, а с другой не углубляется в детали, что позволяет читателю не терять нить повествования о работе силикатеинов.

В целом, диссертационная работа Поваровой Н.В. производит благоприятное впечатление. Исследование выполнено на высоком методическом уровне, выводы, сформулированные в работе, основываются на большом экспериментальном материале, полученном с помощью различных методов молекулярной биологии, биохимии и биофизики.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

На сегодняшний день очень мало сведений о том, как силикатеины осуществляют свою основную функцию – полимеризацию кремнезема. Кроме того, несмотря на перспективы использования силикатеинов в биотехнологии для получения наноматериалов не разработаны легкодоступные субстраты этих ферментов. На мой взгляд, основная ценность полученных в диссертационной работе Поваровой Н.В. результатов состоит, в первую очередь, в нахождении нового субстрата для образования кремнезема силикатеинами – тетраглицерол ортосиликата. Этот субстрат хорошо растворим в водных растворах при физиологических значениях pH, малотоксичен для клеток млекопитающих, легкодоступен для фермента, что определяет существенно большую активность силикатеина по отношению к этому субстрату, по сравнению с другими. Выбор тетраглицерол ортосиликата определил дальнейший успех диссертационной работы. Значительное упрощение детекции продукта за счет большой активности силикатеинов на этом субстрате позволило хотя бы частично ответить на вопрос о механизме катализа силикатеинов. Стало очевидно, что остатки активного центра ферментов не играют в этом процессе определяющей роли. По всей видимости, конфигурация и заряд поверхности молекулы фермента критичны для осуществления реакции полимеризации, что подтверждено данными точечного мутагенеза и анализа вторичной структуры мутантов силикатеина. В поддержку этого предположения выступают и данные по силикатеиновой активности катепсина L человека, являющегося родственным силикатеинам ферментом, для которого в диссертационной работе была продемонстрирована силикатеиновая активность. Таким образом, полученные в работе данные и сделанные выводы имеют

как теоретическую, так и практическую значимость для развития биохимии силикатеинов и их применения в биотехнологии.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса современных методов исследований, продуманным анализом полученных данных и сопоставлением их с известными из литературы фактами. Выводы диссертационной работы Поваровой Н.В. написаны чётко и кратко, полностью охватывают поставленные в начале работы цели и задачи. Выводы точно соответствуют содержанию работы и позволяют считать основную цель работы достигнутой. Содержание автореферата полностью отражает суть работы, основные результаты и выводы диссертации. Результаты диссертации опубликованы в серьезных профильных журналах, что свидетельствует о высоком уровне работы и значительном интересе к ней со стороны научного сообщества.

При ознакомлении с диссертацией у оппонента возникли следующие вопросы и 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 A1 и α . Белки отличаются величиной поверхностного заряда и максимум их активности достигается при разных значениях pH. 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. Тогда вывод о влиянии заряда молекулы на активность являлся бы обоснованным.
4. Автор несколько раз выбирает тетраглицерол ортосиликат в качестве наилучшего субстрата (стр. 59 и 69). Достаточно было один раз это указать.

Однако необходимо отметить, что вышеизложенные замечания носят частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают общую положительную оценку работы.

Заключение

На основе вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа Поваровой Натальи Владимировны является законченным научным исследованием и соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сама Наталья Владимировна, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент

Кандидат химических наук
по специальности 03-01-03 – Молекулярная биология,
ведущий научный сотрудник Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатории конформационного
полиморфизма белков в норме и патологии

Митькевич В.А.

119991, г. Москва, ул. Вавилова 32,
Рабочий телефон +7(499)1359824
e-mail: mitkevich@gmail.com

Подпись Митькевича В.А. заверяю
Ученый секретарь ИМБ РАН, к.в.н.



Бочаров А.А.