

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Каменева Дмитрия Геннадьевича

«Исследование рекомбинантного силикатина LoSilA1 и катепсина LoCath морской губки *Latrunculia oparinae*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионапотехнологии).

Важным и быстро развивающимся направлением современной биологии является создание трансгенных организмов. Они могут служить хорошими экспериментальными моделями для познания клеточных и молекулярных механизмов функционирования живых существ, для создания высокопроизводительных сортов растений и пород животных и для получения различных веществ для медицины и промышленности. И тема, выбранная для диссертации Дмитрия Геннадьевича, несомненно, актуальна, поскольку затрагивает проблемы получения трансгенных растений, т.е. проблемы, которые в настоящее время привлекают внимание многих ученых и имеют большое практическое и теоретическое значение. Известно, что соединения кремния используются во многих отраслях промышленности, особенно в оптике, электронике и вычислительной технике. Получение высокоупорядоченных кристаллических структур соединений кремния является сложной, трудоемкой и дорогой задачей. В этой связи формирование биосиликатов, обладающих заданными свойствами, является перспективным направлением современной биотехнологии. Очевидно, что для разработки этих задач требуются детальные исследования различных модельных объектов. Особый в этой связи интерес, безусловно, представляют губки, у которых обнаружены вещества, способные осуществлять формирование упорядоченных кремниевых структур. Предложенный автором подход, связанный с введением определенных генов губки *Latrunculia oparinae* в растения табака, позволяет в дальнейшей не только изучать внутриклеточные механизмы силификации, но и разрабатывать технологии получения нанокристаллов кремния.

Объем и структура представленной работы отвечают всем требованиям, предъявляемым к диссертациям соответствующего уровня. Диссертация изложена на 101 странице и построена по традиционному плану: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Диссертация проиллюстрирована 6 таблицами и 22 рисунками. Список литературы состоит из 125 наименований, из них 113 на иностранных языках.

Во Введении достаточно четко, ясно формулируется и вполне убедительно обрисована актуальность научной проблемы, цели и задачи исследования, а также научная новизна, теоретическое и практическое значение работы.

В главе «Обзор литературы» рассматриваются процессы биоминерализации и биосилификации у различных организмов, а также белки, которые в этом задействованы. Отдельные разделы посвящены губкам и механизмам формирования у них спикул. Дано описание особенностей кремниевых спикул и их свойств. Приводится известный фактический материал по силикатеинам и катепсинам, которые, вероятно, участвуют в биогенезе спикул. Здесь мы найдем подробное описание строения этих белков у разных видов, гипотезы, объясняющие их функционирование. Кроме того, в отдельных разделах приводятся данные о методах создания экспрессионных систем, строении кристаллов кремния, особенностях формирования наночастиц металлов. Все это вводит читателя в суть проблемы. Следует отметить, что в главе «Обзор литературы» цитируется как классическая литература, так и современная, мировая литература по теме диссертации. Обзор литературы даст достаточную и, в ряде случаев, исчерпывающую информацию, позволяющую понять, что проблема биоминерализации требует специальных дополнительных исследований.

В главе «Материалы и методы» приводится подробное описание использованного автором набора методов: от стандартных методов содержания и культивирования растений до современных методик биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии. Следует отдельно подчеркнуть, что для решения поставленных задач соискателем был задействован весьма широкий спектр методов, что является одним из достоинств рецензируемой работы.

В главе «Результаты и обсуждение» последовательно изложены данные, полученные непосредственно самим автором. Вначале описываются особенности экспрессии генов силикатеинов и катепсина. Показано, что наиболее активно экспрессирующейся формой является LoSilA1. Именно эта форма была выбрана для клонирования в вектор и дальнейшей работы. Автором были созданы различные генетические конструкции на основе определенных векторов. Для этого был использован, в общем, стандартный подход, который, тем не менее, является современным и требует высокого уровня методической подготовки. В результате впервые были созданы конструкции, содержащие гены силикатеина и катепсина губки. Это обеспечило успешное выполнение поставленных задач.

В последующем разделе главы «Результаты и обсуждение» описывается полимеризация кремния *in vitro* под действием изучаемых белков. Автору удалось экспрессировать рекомбинантные силикатеин и катепсин в бактериях, наработать и выделить их в необходимом количестве, что позволило продемонстрировать возможность получения отдельнолежащих

кристаллических структур кремния с помощью данных белков. Эти данные также являются приоритетными. Результаты проведенных исследований, а также анализа структуры кристаллов кремния позволяют предполагать наличие общего механизма полимеризации кремния в этих белках, что согласуется с существующей теорией.

Несомненным украшением рецензируемой диссертации является получение трансгенных растений табака, содержащих ген силикатеина губки. Такая работа была проведена впервые. Это позволило определить локализацию силикатеина в организме. Данные о местах накопления белка в дальнейшем могут быть использованы для оптимизации методов выделения силикатеина, а также для создания эффективных культур-продуцентов.

Последний раздел главы посвящен экспериментам по восстановлению нитрата серебра экстрактом трансгенных растений. Автор показал, что экстракт трансгенной культуры табака, экспрессирующей LoSilA1 ускоряет образование наночастиц серебра при смешивании с раствором $AgNO_3$ и вызывает образование более гомогенных мелких наночастиц в большем количестве, чем экстракт контрольной культуры. Полученные данные позволяют предположить, что использование культур клеток, трансформированных геном LoSilA1 более перспективно для дальнейшего биотехнологического использования.

Важно отметить, что результаты работы хорошо проиллюстрированы качественными фотографиями и схемами.

Каждый раздел главы «Результаты и обсуждение» содержит сравнительный анализ своих результатов с данными, ранее известными на других видах. Здесь Дмитрий Геннадьевич показал не только глубокое знание проблемы, но способность к самостоятельному критическому анализу большого массива данных.

В главе «Заключение» автор кратко подводит итоги. Выводы – логическое завершение анализа полученных результатов.

Д.Г. Каменевым было проведено оригинальное исследование рекомбинантных белков силикатеина и катепсина морской губки *Latrunculia oparinae*. Применение трудоемких, но современных и высокоразрешающих методов в сочетании с экспериментальным подходом позволило изучить некоторые свойства данных белков и получить трансгенные растения, экспрессирующие силикатеин губки. Следует отметить, что большинство из приведенных автором результатов получено впервые, это дает новый материал для сравнительных исследований. Результаты работы Д.Г. Каменева имеют значительную научную и практическую ценность. Полученные данные позволяют лучше понять тонкие механизмы биосилификации и создают предпосылки для будущего использования рекомбинантных кремний-полимеризующих белков.

У меня нет принципиальных замечаний по существу представленной диссертации. Диссертация четко структурирована и написана ясным языком. Содержание автореферата правильно отражает основные положения диссертации. Диссертация в целом представляет собой законченный научный труд, в котором содержится решение задачи, имеющее существенное значения для данного направления фундаментальной науки.

Однако работа не лишена небольших недостатков. Не совсем оправданным, на мой взгляд, является помещение собственных данных автора в раздел 1.3. главы «Обзор литературы», где на стр. 25 приводятся результаты работы по клонированию и определению нуклеотидных последовательностей транскриптов генов силикатеинов и катепсинов. Более логично поместить описание выделения и определения силикатеинов и катепсина в самом начале главы «Результаты и обсуждение», предваряя данные об активности экспрессии этих генов. В этом же разделе «Обзора литературы» (стр. 20-24) помещен большой массив данных о белках губок *Acanthodendrilla sp.* и *Aulosaccus schulzei*, при этом не приводится ни одной ссылки ни на одну работу. Указывается только, что белки *Acanthodendrilla sp.* изучались в лаборатории биоинженерии (стр. 20), а белки *Aulosaccus schulzei* в лаборатории биоинженерии (стр. 21). Не понятно, это одно структурное подразделение или нет и какому институту они (оно) принадлежат.

Достаточно много внимания в работе было уделено свойствам и получению наночастиц серебра. Однако ни во введении, ни в обзоре литературы нет ясного объяснения того, для чего это делается. Целью данной работы «... являлось получение и исследование каталитических свойств рекомбинантного силикатеина LoSilA1 и катепсина LoCath морской губки *Latrunculia oparinae*». Из обзора литературы не ясно, какова связь между каталитическими свойствами исследуемых белков и получением наночастиц серебра. Кроме того, в главе «Результаты и обсуждение» нет доказательств того, что именно силикатеин способствует выпадению металлического серебра из раствора. Силикатеин, экспрессируясь в трансгенном растении, без сомнения, влияет на биосинтетические процессы, происходящие в организме. Соответственно экстракты из трансгенного и нетрансгенного растений будут отличаться по содержанию многих компонентов, не только силикатеина. К тому же, как пишет сам автор (стр. 73), содержание силикатеина в тканях невелико. Кроме того, влияние собственно экспрессии силикатеина на формирование наночастиц серебра не исследовалось. В этой связи, на мой взгляд, задачу № 6 нельзя считать полностью выполненной.

В тексте часто встречаются неправильно оформленные ссылки на литературу. В подписях к рис. 2 не указано, что изображено на отдельных фотографиях. Фотография электрофореза на рис. 19 имеет низкое качество и даже с помощью стрелки на ней трудно

разглядеть полосу, по молекулярной массе соответствующей силикатину LoSilA1. В работе имеются неудачные и сленговые выражения («... последовательность слита с GFP...»); «... был произведен поиск генов силикатиннов в кДНК безникульной губки ...») и опечатки.

Перечисленные замечания не влияют на общую высокую оценку работы Д.Г. Каменева и не ставят под сомнение основные результаты и выводы диссертации.

Основные результаты диссертации опубликованы в реферируемых отечественных и зарубежных журналах и многократно представлены на российских и международных конференциях. По теме диссертации автором опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК, а также 6 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Таким образом, диссертационная работа «Исследование рекомбинантного силикатина LoSilA1 и катепина LoCath морской губки *Latrunculia oparinae*» соответствует критериям п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени, а ее автор, Каменев Дмитрий Геннадьевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заведующий лабораторией сравнительной
цитологии Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук,
доктор биологических наук
Адрес: 690041, Владивосток, ул. Пальчевского 17,
тел. 8 423 2311178, e-mail: idolmatov@mail.ru

И.Ю. Долматов

16.02.2016

Долматов Игорь Юрьевич, зав. лаб. сравнительной цитологии ИБМ ДВО РАН,
доктор биологических наук



подпись *И.Ю. Долматов*
Заверено начальником О.А.
Буреника В.Л.



Сведения об оппоненте
 по диссертационной работе **Каменева Дмитрия Геннадьевича**
 на тему «**Исследование рекомбинантного силикатина LoSilA1 и катепсина LoCath**
морской губки *Latrunculia oparinae*»
 представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
 специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Фамилия Имя Отчество	Долматов Игорь Юрьевич
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	03.03.05 – биология развития, эмбриология
Ученая степень и отрасль науки	доктор биологических наук
Ученое звание	старший научный сотрудник
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук
Занимаемая должность	заведующий лабораторией сравнительной цитологии ИБМ ДВО РАН
Почтовый индекс, адрес	690041, Российская Федерация, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.
Телефон	423 231 11 78
Адрес электронной почты	idolmatov@mail.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<p>Гирич А.С., Долматов И.Ю., Ламаш Н.Е. Распределение белка Wnt5 в тканях голотурии <i>Eupentacta fraudatrix</i> (Holothuroidea, Dendrochirotida) в норме и при регенерации // Биология моря. 2014. Т. 40, № 1. С. 70–74.</p> <p>Долматов И.Ю. Новые данные по бесполому размножению, аутомии и регенерации голотурий из отряда Dendrochirotida // Биология моря. 2014. Т. 40, № . С. 240–244.</p> <p>Kamenev Ya.O., Dolmatov I.Yu. Posterior regeneration following fission in the holothurian <i>Cladolabes schmeltzii</i> (Dendrochirotida: Holothuroidea) // Microscopic Research and Technique. 2015. V. 78. P. 540–552.</p> <p>Bobrovskaya N.V., Dolmatov I.Yu. Autotomy of the visceral mass in the feather star <i>Himerometra robustipinna</i> (Crinoidea, Comatulida) // Biological Bulletin. 2014. V. 226. P. 81–91.</p> <p>Dolmatov I.Yu. Asexual reproduction in holothurians // Scientific World Journal. 2014. Article ID 527234.</p>

Lamash N.E., Dolmatov I.Yu. Proteases from the regenerating gut of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // PLoS ONE. 2013. V. 8, № 3. P. e58433.
doi:10.1371/journal.pone.0058433.

Dolmatov I.Yu., Frolova L.T., Zakharova E.A., Ginanova T.T. Development of respiratory trees in the holothurian *Apostichopus japonicus* (Aspidochirotida: Holothuroidea) // Cell and Tissue Research. 2011. 346: 327–338

Верно

Ученый секретарь
ИБМ ДВО РАН



Жуков В.Е.

«__» _____ 2015 г.

М.П.