



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ЛИН СО РАН, д. г.-м. н.

А.П. Федотов

«15» февраля 2016 года

ОТЗЫВ

ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук
на диссертацию Каменева Дмитрия Геннадьевича
«Исследование рекомбинантного силикатеина LoSilA1 и катепсина Locath морской губки *Latrunculia oparinae*»
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.06 – биотехнология

Кремний по распространенности в земной коре является вторым (после кислорода) элементом, хотя в живой природе встречается значительно реже. Несмотря на относительно небольшое содержание, кремний играет существенную роль в животных и растениях (Bendz&Lindqvist, 1977), которая не выявлена до конца, особенно на молекулярном уровне. Кремний в живых системах встречается только в четырехвалентном состоянии (Si^{4+}) и входит в состав двуокиси кремния, кремнезема ($SiO_2 \cdot nH_2O$), поликремниевых кислот или эфиров ортокремниевой кислоты (Simpson&Volcani, 1981). Биогенный кремнезем является основным компонентом створок диатомовых водорослей, спикул губок, режущих кромок растений, кроме того эфиры ортокремниевой кислоты входят в состав фосфолипидов, белков и пектинов (Колесников, 2001).

Метаболизм кремния, синтез клеточной стенки одноклеточных водорослей – диатомей и нанотехнологии на их основе хорошо изучены группой под руководством Марка Хильдебранда из института океанографии США. Многоклеточные организмы (губки) в этом плане изучены гораздо хуже и, фактически все исследования, основаны на работе (Shimizu et al, 1998). В этой работе был выделен и идентифицирован белок из спикул губок – силикатеин и было показано, что он является аналогом обычных сериновых протеаз с заменой одной аминокислоты в активном центре фермента. Было показано, что, как выделенный из спикул, так и рекомбинантный силикатеин способен гидролизовать эфир кремниевой кислоты – тетраэтоксисилан (TEOS) с образованием аморфного кремнезема. Работы последователей в основном посвящены обнаружению генов силикатеина в различных губках, но не изучения белка – силикатеина, как такового.

В Российской Федерации исследования метаболизма кремнезема в губках находятся в зачаточном состоянии, несмотря на потенциальную значимость процесса в нанотехнологии, микроэлектронике, оптике и т.д. В этой связи актуальность темы не вызывает сомнения.

Целью представленной диссертации является исследование и разработка методов получения рекомбинантных белков - силикатеина и катепсина морской губки *L. oparinae* и изучение их каталитических свойств. Особо ценным является получение рекомбинантного силикатеина в трансгенных растениях.

Рассматриваемая работа является первой попыткой экспрессии генов силикатеина в растениях и оценки его каталитических свойств в реакции осаждения кремнезема. Кроме того, диссертантом показано, что рекомбинантный силикатеин из экстрактов трансгенных растений приводит к образованию наночастиц серебра.

Данная диссертация содержит все необходимые по правилам ВАК разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, выводы, список цитированной литературы

Раздел «Обзор литературы» объемом 33 страниц посвящена проблеме биоминерализации живых систем на примере губок, синтезирующих большое количество кремнистых спикул и состоит из шести разделов.

Раздел «Материалы и методы» детально описывает методы выделения целевых генов, методы получения генетических конструкций для экспрессии белков в бактериях и клеточных культурах табака, а также методы выделения и анализа полученных рекомбинантных белков.

Раздел «Результаты и обсуждения» написан очень кратко, объем его составляет всего 19 страниц. Несомненно, что эту главу можно было расширить, учитывая объем проделанной экспериментальной работы. Полученные диссертантом результаты являются очень интересными и достойными детального обсуждения, но, по непонятным причинам, иногда они просто не обсуждаются либо разбросаны по другим главам. Например, анализ генов силикатеина и катепсина губки *L. oparinae* описан в главе «Обзор литературы» на стр.25-28, но ссылка на первоисточник не приведена.

В разделе впервые описаны результаты по сравнительному изучению осаждения кремнезема рекомбинантными силикатеинами и катепсинами, в том числе и слитыми с флуоресцентным белком. Ранее считалось, что именно наличие в активном центре силикатеина замены Cys/Ser способствует гидролизу эфиров кремниевой кислоты, в то время как катепсин является протеазой, способной гидролизовать пептидные связи, а не эфиры кремниевой кислоты, и не способен осаждавать кремнезем. Диссертантом показано, что оба белка способны осаждавать кремнезем, хотя катепсин не имеет характерной замены

в активном центре протеазы. Этот экспериментальный факт ставит под сомнение ранее существовавшую гипотезу о роли замены в активном центре фермента, но это наблюдение диссертантом никак не обсуждается. Также не обсуждаются причины образования кристаллов кремнезема разной формы для силикатеина и катепсина, и диссертант не делает никаких попыток объяснить эти факты.

В экспериментах по осаждению кремнезема вместо общепринятого источника кремния – тетраэтоксисилана (TEOS), неправильно названный диссертантом «тетраэтилортосилян» использован «тетра-гидроксиэтил-ортосилян». Правильное название этого соединения – тетра (гидроксиэтил) ортосиликат. Диссертант нигде не объясняет причину этого выбора и не задается вопросом, можно ли сравнивать полученные данные с опубликованными ранее экспериментами с использованием TEOS.

Необходимо особо отметить, что, Каменев Д.Г. на протяжении всего текста диссертации слишком вольно обращается с понятием «кремний». Мы надеемся, что диссертант знает, элемент кремний в организме живых существ имеется только в окисленной форме, либо в виде кремниевой кислоты или ее солей (силикатов), либо в виде эфиров кремниевой кислоты, либо в виде окиси кремния. Нельзя писать «формирование кристаллов кремния» в то время как описывается образование кристаллов кремнезема (или гидратированного кварца). См. стр.64-65, например.

Приведем еще несколько замечаний к разделу 3 «Материалы и методы».

3.1. Определение уровней экспрессии... Написано, что использовали ПЦР в реальном времени, но сам метод не описан ни в этой главе, ни главе «Материалы и методы»

3.2. Написано: «Созданы четыре генетических конструкций, содержащих рекомбинантный силикатеин». Следует писать *ген* силикатеина, а не белок.

Написано: Ген GFP имеет «модифицированную кодонную структуру». Этот термин в лучшем случае, является сленгом, кроме того, из текста не понятно, модифицировал «кодонную» структуру диссертант или в работу был взят коммерчески доступный вариант гена.

3.3. Кристаллы кремния и состав кристаллов... (имеется ввиду кристаллов кварца)

В подразделе описано, без приведения доказательств, что силикатеин накапливался в телах включения, поэтому для его выделения использовался рефолдинг. Но методика проведения рефолдинга не описана, также как не приведены доказательства существования как телец включения, так и результатов рефолдинга. Катепсин, являющийся близким аналогом силикатеина, удалось получить в растворимом виде, но причины различий в поведении близкородственных белков не обсуждаются. Не обсуждается также, почему, судя по фореграммам, приведенным на рисунках 15 и 16,

LoSilA1 имеет массу около 19 кДа, а родственный ему LoCath – 55 кДа. В тоже время не ясно почему силикатеин, выделенный из каллусной культуры, имеет массу около 25 кДа. (подраздел 3.4).

3.4. Написано, что получены растущие в почве растения табака, экспрессирующие различные гены силикатеина. Но никакие данные, иллюстрирующие эти эксперименты, не приведены, в выводах этих данных также нет.

3.5. В этом подразделе описывается неожиданное, но чрезвычайно интересное для биотехнологического применения образование наночастиц серебра под действием экстрактов полученных рекомбинантных растений. Но диссертант вновь не приводит описание деталей эксперимента, не приводит концентрации экстракта клеток и раствора нитрата серебра, температуру, pH, длительность реакции и так далее. Не описано также чем и каким образом осаждали образовавшиеся наночастицы. Такое игнорирование деталей эксперимента не позволяет оценить его достоверность и вынуждает нас усомниться в результатах. Из личной беседы с диссертантом мы выяснили, что наночастицы серебра действительно получают, потому мы рекомендуем запатентовать метод и оформить статью в рецензируемом журнале.

Таким образом, оформление диссертации в целом вызывает нарекания, в связи с чем мы рекомендуем диссертанту впредь внимательнее относиться к оформлению результатов и не бояться выдвигать гипотезы и объяснения своих результатов.

По мнению специалистов ведущей организации, наиболее важными результатами диссертации являются следующие:

получены бактерии и трансгенные культуры клеток растений (табака) с использованием разработанных диссертантом генетических конструкций, содержащих различные гены силикатеина и катепсина;

показано, что оба белка (силикатеин и катепсин), экспрессируемые бактериями, способны осажждать кремнезем, в том числе с образованием кристаллов кварца различной структуры;

показано, что в трансгенных культурах табака экспрессируется рекомбинантный силикатеин, способствующий образованию наночастиц серебра в процессе фитосинтеза.

В целом работа является серьезным вкладом в изучение важного этапа биоминерализации у многоклеточного организма – этапа отложения кремнезема в спикулы губок. Мы рекомендуем продолжение работы в этом направлении, в том числе с другими белками – предполагаемыми потенциальными участниками сложного процесса биоминерализации.

Работа достаточно представлена публикациями в отечественных и зарубежных научных журналах и содержит новую и ценную научную информацию.

Выводы написаны понятным языком, базируются на полученных автором экспериментальных результатах и обоснованы.

Автореферат в полном объеме отражает материал диссертационной работы. Выносимые на защиту положения сформулированы четко и кратко. Результаты работы отражены в трех статьях и доложены на шести конференциях.

Диссертационная работа Каменева Дмитрия Геннадьевича является законченным исследованием, важность поставленных и решенных в диссертации задач, современный методический уровень их решения, несомненная значимость работы позволяют сделать заключение, что диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор Каменев Д. Г. заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по специальности 03.01.06 – биотехнология.

Диссертационная работа Каменева Д. Г. обсуждена и поддержана на заседании научного семинара лаборатории аналитической биоорганической химии Лимнологического института СО РАН.

Доктор биологических наук, профессор
Заведующий лабораторией аналитической биоорганической химии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Лимнологического института Сибирского отделения Российской
академии наук (ЛИН СО РАН)

640033, г. Иркутск,
ул. Улан-Баторская, 3; тел. (3952)51-18-74
E-mail: sergeibelikov47@gmail.com



Беликов Сергей
Иванович

«15» февраля 2016 г.

Подпись д.б.н. Беликова Сергея Ивановича заверяю
и.о. ученого секретаря ЛИН СО РАН,
к.б.н.



Максимова
Наталья
Васильевна

Биолого-почвенный институт ДВО РАН
Входящий № 38
« 19 » 02 20 16 г.

Сведения о ведущей организации
по диссертационной работе **Каменева Дмитрия Геннадьевича**
на тему «**Исследование рекомбинантного силикатеина 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)

1. Полное наименование и сокращенное наименование организации в соответствии с уставом

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН)

2. Почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты (при наличии), адрес официального сайта в сети «Интернет» (при наличии)

664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская - 3, а/я 278.

телефон: (3952) 42-65-04

факс: (3952) 42-54-05

адрес электронной почты: info@lin.irk.ru

www-страница: http://www.lin.irk.ru

3. Полные Ф.И.О. составителя отзыва

Беликов Сергей Иванович

4. Ученая степень; ученое звание; должность и структурное подразделение (лаборатория, кафедра и т.п.)

д.б.н., профессор, заведующий лабораторией, лаборатория Аналитической биорганической химии.

5. Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых журналах за последние 5 лет (не более 15 публикаций)

Калюжная О. В., А. Г. Красько, В. А. Гребенюк, В. Б. Ицкович, Н. А. Семитуркина, И. С. Соловаров, W. E. G. Mueller, С. И. Беликов. Силикатеины пресноводных губок: сравнение последовательностей и экзон-интронных структур генов // Молекулярная биология; 2011; 45(4):617-626.

Chernogor LI, Denikina NN, Belikov SI, Ereskovsky AV. Long-term cultivation of primmorphs from freshwater Baikal sponges *Lubomirskia baicalensis* // Mar Biotechnol (NY). 2011. 13(4):782-92.

Ицкович В.Б., Калюжная О.В., Беликов С.И. Исследование полиморфизма участков ядерной и митохондриальной ДНК у близкородственных видов эндемичных байкальских губок // Генетика; 2013; 49(8):966-974.

Черногор Л.И., Кондратов И.Г., Кулакова Н.В., Деникина Н.Н., Беликов С.И. Экспрессия силикатеинов на модельной клеточной культуре примморф байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* // Фундаментальные исследования; 2014; (11):2455-2459.

Ereskovsky A.V., Chernogor L.I., Belikov S.I. Ultrastructural description of development and cell composition of primmorphs in endemic Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* // Zoomorphology. 2016; 135(1), pp 1-17. DOI 10.1007/s00435-015-0289-0

Верно

Руководитель организации

«___» _____ 20__ г.

М.П.



Д. Г. - м. н. Федотов А. П.