

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

**Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН
28 октября 2020 года**

**Защита диссертации
на соискание учёной степени кандидата химических наук**

Владимирова Василий Игоревича

**По теме: «Роль кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных кальциевых
сенсоров в фоторецепторной системе»**

Специальность 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Москва - 2020

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 28 октября 2020 года

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Учёный секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

1. Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
3. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
4. Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
5. Академик РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
6. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
7. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
8. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
9. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
10. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
11. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
12. Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
13. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
14. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
15. Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
16. Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(02.00.10)
17. Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
18. Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
19. Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)
20. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

Иванов В.Т., председатель:

Значит, речь идёт о защите кандидатской диссертации Василием Игоревичем Владимировым, тема всем понятна, я не буду её зачитывать, давайте послушаем материалы личного дела.

Олейников В.А., учёный секретарь:

Да, итак, Владимиров Василий Игоревич, Российская Федерация, окончил Тульский государственный университет по специальности «химия» в 2012 году. С 2014 по настоящее время он младший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН, филиала нашего института. Кандидатский экзамен по специальности «биоорганическая химия» сдан с оценкой отлично. Работа выполнена в лаборатории фармакокинетики филиала института нашего, в ФИБХ РАН. научный руководитель работы – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Зинченко Дмитрий Валерьевич, опять же, ФИБХ. По теме диссертации опубликованы 4 научные статьи в рецензируемых журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно – 24 августа 2020 года, и все необходимые документы в деле имеются.

Иванов В.Т., председатель:

Какие-то вопросы, замечания, исправления? Обычно их не бывает. Данный случай не исключение. Ну а теперь даю слово диссертанту, Василий Игоревич, вам слово.

Владимиров В.И., соискатель:

(излагает основные положения диссертационной работы)

Иванов В.Т., председатель:

Совершенно верно. Обращаемся к аудитории, есть ли вопросы к докладу?

Да, прошу вас.

Олейников В.А., учёный секретарь:

Опять же, я обращаюсь к тем, кто в удалённом доступе, в принципе вы тоже можете задавать ваши вопросы.

Белогуров А.А.:

У меня вопрос по вашему последнему выводу по поводу кавеолина-1 и имитации фосфорилированного остатка по четырнадцатому положению. Скажите, пожалуйста, это

ваша идея была имитировать фосфорилированный тирозин, как я понимаю, остатком глутаминовой кислоты? Или вы где-то её почерпнули? Потому что всё-таки структурно, мне кажется, они довольно сильно отличаются.

Владимиров В.И., соискатель:

Да, действительно, это так, и это даже был вопрос одного из оппонентов. Всё дело в том, что в исследованиях с кавеолином-1 было несколько публикаций, в которых использовали такую замену, и показали, что поведение белка в таком случае, на клеточной модели эквивалентно по введению фосфорилирования кавеолина, поэтому мы решили, что можно попробовать использовать такую вариацию. То есть мы отталкивались от литературных данных

Иванов В.Т., председатель:

Понятно, ещё вопросы? Не вижу вопросов, ни из зала, ни из эфира. Спасибо, тогда можете немножко отдохнуть. Научный руководитель хочет охарактеризовать диссертанта?

Зинченко Д.В., научный руководитель:

Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены совета, уважаемые коллеги. Несколько слов о Василии Игоревиче. Василий пришёл в нашу лабораторию в 2012 году, поступив в магистратуру Пушинского государственного естественнонаучного института (ПушГЕНИ). Успешно закончил магистратуру, продолжил обучение в аспирантуре ПушГЕНИ. С первых шагов своей практической научной деятельности Василий проявил себя инициативным, целеустремлённым и грамотным специалистом, исследователем. Он обладает хорошим уровнем коммуникабельности и пользуется уважением коллег. Надо отметить, что представленная работа является не единственным проектом, в котором участвует Василий. Он принимает участие в нескольких крупных межлабораторных научных проектах, которые проходят как внутри института и за пределами. В таких научно-исследовательских центрах, как МГУ, МФТИ, медицинская академия имени Сеченова. Так же хочу отметить, что на протяжении последних нескольких лет Василий является практически самостоятельным руководителем нескольких магистерских работ, проводимых в лаборатории. И как бы, от себя мне хотелось бы сказать, что очень надеюсь, что после защиты диссертации Василий Игоревич не отправится покорять зарубежные лаборатории, а останется трудиться в стенах нашего института. А если и отправится, то ненадолго, чтобы

опять же вернуться в нашу лабораторию с новыми знаниями, новым опытом, и с новыми профессиональными связями, спасибо.

Иванов В.Г., председатель:

Всё понятно, жизнь покажет. Теперь мы должны заслушать отзывы, вернее заключения организации, на работу, где она выполнялась и отзыв ведущей организации.

Олейников В.А., учёный секретарь:

(излагает положительное заключение организации, где выполнялась диссертация)

Во-первых, заключение. Выполнялась она в нашем институте, в филиале нашего института, но всё равно это наш институт. И соответственно здесь биографические данные некоторые, о которых мы уже слышали. Про очную магистратуру в Пущинском государственном естественнонаучном институте и аспирантуре Пущинского государственного института естественнонаучного. Работа выполнена в настоящее время работает в настоящее время в лаборатории биологических испытаний ФИБХ в должности младший научный сотрудник. Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2020 году. Тема диссертационной работы утверждена так же в 2020 году. Научный руководитель, которого мы только что слышали, это Дмитрий Валерьевич Зинченко. Работа была представлена на семинаре отдела пептидно-белковых технологий нашего института. И по итогам обсуждения принято следующее заключение. Опять же, первое, актуальность темы, направленность темы исследования. Тема признана актуальной. Личное участие, вклад Владимирова в представленную диссертационную работу заключался в сборе и анализе литературных данных, планировании научных экспериментов в обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций. Степень достоверности подчеркивается, что выводы полностью обоснованы и соответствуют задачам исследования. Новизна работы, подчеркивается, что всё здесь достаточно оригинально. Практическая значимость – важность вклада, понимание механизмов, и так далее. То есть, практическая значимость тоже подчеркивается, что это есть. Соответствие научной специальности так же признано что соответствует специальности 02.00.10 биоорганическая химия. Полнота изложения, тут перечислен список научных публикаций, в которых изложены диссертационные результаты – четыре публикации в хороших журналах. Результаты, проведённых исследований, то, что мы сейчас слышали из изложения диссертанта. И таким образом, представленная диссертация удовлетворяет требованиям, предъявляемым

диссертационным работам, и рекомендуется к представлению к защите на соискание учёной степени кандидата химических наук по соответствующей специальности. Это заключение принято на семинаре отдела пептидно-белковых технологий нашего института. Присутствовали 29 человек, за – 29, против – нет, воздержавшихся – нет. Подписано председателем семинара Вадим Тихоновичем Ивановым, и зам. Директора ИБХ РАН, доктором химических наук – Ямпольским. Утверждено директором нашего института – академиком Александром Габировичем Габировым, это что касается заключения.

(зачитывает положительный отзыв ведущей организации)

Теперь отзыв ведущей организации. Отзыв тоже полностью положительный. Ведущая организация – это Институт биологии гена российской академии наук. Классически начинается с того что подчёркивается актуальность исследования. Пишется, что диссертация Владимирова посвящена актуальной и важной проблеме изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе кальциевой чувствительности нейрональных кальциевых сенсоров – НКС. И одним из факторов, влияющих на кальциевую чувствительность НКС является основной регуляторный белок – кавеолин. Известно, что кавеолин широко экспрессируется в наружных сегментах фоторецепторных клеток, где расположена система генерации и передачи зрительного сигнала, и актуальность изучения роли кавеолина в регуляции функционирования зрительной системы сомнений не вызывает. Цель работы – изучение функциональной роли кавеолина, для достижения цели автор поставил пять задач, перечислены эти пять задач, но это уже было сказано в докладе. В ходе выполнения работы Владимировым был выявлен новый белковый партнёр НКС, охарактеризованы стабильные компоненты НКС - кавеолин-1, активно участвующей в кальций-зависимой регуляции функционирования зрительной системы в норме, и в условиях окислительного стресса. В целом результаты работы вносят существенный вклад в понимание механизмов, отвечающих за приём и передачу кальциевых сигналов. Структура – 120 страниц, источников 170, схема классическая. Обзор - несколько разделов хорошо структурирован, написан логично, содержит большой объём современной информации. Материалы и методы – приводятся использованные в работы методологические процедуры, демонстрирующие высокий методологический уровень диссертации, что является важным достоинством диссертации. В работе использовано большое число современных молекулярно-биологических и биохимических методов. Достаточное количество контролей и статистический анализ заставляют не сомневаться в достоверности полученных

результатов. Результаты и обсуждение, в этом разделе изложены полученные экспериментальные результаты, проведён их анализ. Основной результат диссертации – выявление новой регуляторной функции интегрального белка мембранных рафт-структур, кавеолина, в отношении белков семейства НКС зрительной системы. Далее, был в конце раздела вывод, который сформулирован чётко и обосновано, вытекает из результатов исследования. Автореферат диссертанта Владимирова содержит все необходимые данные, поставленные задачи и актуальности и её решения в рамках работы. Научная новизна – в работе подробно охарактеризована новая функция белка мембранных рафт-структур кавеолина-1, в отношении белков семейства НКС зрительной системы. Впервые продемонстрировано влияние точечной мутации кавеолина-1. Впервые обнаружено образование окисленных форм рековерина, в условиях окислительного стресса *in vivo*, и охарактеризовано взаимодействие кавеолина-1 с указанными формами. Кроме того, разработана новая методика получения рекомбинантных НКС, включая разделение миристилированной и немристилированной форм этих белков. В целом, результаты работы вносят существенный вклад в понимание механизмов, отвечающих за приём и передачу кальциевых сигналов. Но работа не лишена недостатков, однако они касаются не существа работы, а её оформления. Это неудачные выражения. Опечатки, иногда очень мелкие подписи к рисункам. Эти недостатки не умаляют ценности диссертационной работы. И в заключении, диссертационная работа Владимирова Василия Игоревича, представленная на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 является завершённой научно-квалификационной работой которая по своей новизне, актуальности и достоверности полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ. А сам Василий Игоревич заслуживает присвоение искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 биорганическая химия. Отзыв обсуждён и утверждён на семинаре лаборатории молекулярной иммуногенетики рака 30.09.2020, протокол №1. Подписан доктором биологических наук, профессором, главным научным сотрудником лаборатории молекулярной генетики рака Института биологии гена, Сащенко Лидией Павловной. Отзыв утверждён директором Института биологии гена РАН, академиком Георгиевым.

Иванов В.Т., председатель:

Констатируются опечатки, наличие погрешностей в описании, но нет конкретики, поэтому я не вижу необходимости отвечать на данный вопрос. Согласны со мной? Если да, то продолжим.

Олейников В.А., учёный секретарь:

Отзыва на автореферат нет

Иванов В.Т., председатель:

И тогда мы переходим к заслушиванию официальных оппонентов. У нас такая своеобразная ситуация. Один оппонент у нас будет в режиме онлайн, а второй болен.

Габибов А.Г., директор ИБХ РАН:

Да, Кочетков Сергей Николаевич болен Covid-19 и давно уже.

Олейников В.А., учёный секретарь:

(зачитывает положительный отзыв Кочеткова С.Н.)

Официальный оппонент – Кочетков Сергей Николаевич, академик РАН, доктор химических наук, профессор, зав лабораторией молекулярных основ действия биологически активных соединений Института молекулярной биологии имени Энгельгардта. Отзыв полностью положительный, и вот что в нём пишется: исследование молекулярных факторов, определяющих развитие и функционирование фоторецепторных клеток и нейронов, проведённое в диссертационной работе Владимирова В.И. является чрезвычайно актуальным, и затрагивает такие области науки как биохимия, молекулярная биология и геновая инженерия. Учитывая высокую сложность организации и функционирования нервной ткани, а также недостаточную степень изученности патологических процессов, медикаментозное лечение широкого круга нейроофтальмологических и нейродегенеративных заболеваний, в настоящее время, существенно затруднено. Отсюда, выбранное автором направление - изучение молекулярных основ обеспечения кальций-чувствительности, локализации и активности белков-регуляторов функционирования фоторецепторной и нервной ткани является чрезвычайно актуальным. В представленной работе, автор сфокусировался на роли мультифункционального белка кавеолин-1 в возможной регуляции им белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров (НКС), которые являются кальций-чувствительными модуляторами ключевых ферментов,

вовлечённых в систему генерации и передачи нервного импульса в различных типах клеток. Несмотря на то, что центральным объектом, изучаемым в работе, являются белки преимущественно локализирующиеся в наружных сегментах фоторецепторных клеток - палочек, важно отметить, что полученные в работе данные, касательно регуляции активности белков НКС, можно использовать при изучении функционирования в норме и при патологиях, как фоторецепторных клеток, так и нейронов. Диссертационная работа Владимирова В.И. построена по стандартной схеме и включает в себя шесть основных разделов. В разделе «обзор литературы» приводится вся необходимая информация о функционировании каскада передачи зрительного сигнала. Большое внимание уделено влиянию окислительного стресса на кавеолин-1, и происходящее при этом изменение регуляторной функции белка. Большой набор использованных в работе методик, описанных в разделе «материалы и методы», говорит о высоком методологическом уровне проведённого исследования. Кроме того, в работе проводились эксперименты с использованием клеточных и животных моделей. В работе использовались методы измерения функциональной активности белков с применением радиоактивных изотопов кальция и фосфора.

Раздел «результаты и их обсуждение» представляет собой развёрнутое описание полученных в работе данных, и может быть условно разделён на несколько частей. В первую очередь идёт описание методики получения и очистки рекомбинантных белков НКС и различных фрагментов кавеолина-1. Не менее значимым является получение и физико-химическая характеристика фрагментов N-концевого домена кавеолина-1. Исследование взаимодействия между НКС и кавеолином-1 несомненно выполнено на высоком уровне, учитывая, что было использовано три различных подхода, широко применяемых для изучения белок-белковых взаимодействий. Значительной частью работы стало изучение поведения НКС рековерина при окислительном стрессе, и влияние окисления на взаимодействие между НКС и кавеолином-1. Подводя итоги работы, автор делает выводы касательно роли кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторной системе. В целом, выводы полностью соответствуют полученным результатам, хорошо структурированы, и позволяют утверждать, что проведённая работа вносит ощутимый вклад в понимание молекулярных механизмов функционирования белков НКС, и регулируемых ими процессов.

Несмотря на это работа не лишена ряда недостатков, а именно: Первое, в работе продемонстрировано влияние кавеолина-1 на взаимодействия НКС со своими мишенями

при избыточных концентрациях кальция (или его полного отсутствия), что не совсем соответствует физиологическим условиям. Отсюда, видится крайне интересным проведение ряда экспериментов в физиологическом диапазоне концентрации внутриклеточного кальция, с целью установления влияния кавеолина-1 на кальций-зависимую функциональную активность НКС. Второе, принимая во внимание эксперименты, проведённые для характеристики использованных в работе конструкций N-концевого фрагмента кавеолина-1, всё же следует разработать способ для оценки функциональной активности препаратов кавеолина-1. Это вопрос актуален так же и по причине того, что использованный в работе фрагмент является по сути только половиной от нативного белка, что наверняка имеет значительные последствия на его фолдинг и функционирование. И третье, предложенная в работе модель взаимодействия между кавеолином-1 и рековерином так же вызывает несколько вопросов. Во-первых, отсутствие точно определённой структуры кавеолина-1, и использование вместо неё компьютерно рассчитанной модели белка накладывает ряд ограничений на возможности молекулярного докинга и интерпретацию, полученных с его помощью результатов. Во-вторых, сильные ограничения размера фрагментов белков, участвующих в моделировании комплекса, что так же уменьшает ценность полученных результатов. И в-третьих, наряду с уже применённым подходом, рекомендуется использование метода молекулярной динамики для повышения достоверности получаемых результатов, а соответственно, и сделанных на их основе выводов о механизме исследуемого белок-белкового взаимодействия.

Тем не менее, указанные недостатки ни в коей мере не умаляют высокой ценности проделанной работы, и полученных результатов. В диссертационной работе Владимирова В.И. проведено полномасштабное исследование, которое демонстрирует высокий профессионализм и научную грамотность диссертанта. Широкий набор применённых в работе методологических подходов и анализ полученных результатов, не оставляют сомнений в квалификации автора. Таким образом, представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук. А сам автор работы - Владимирова Василий Игоревич, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия. Официальный оппонент – Сергей Николаевич Кочетков, титулы которого ранее были зачитаны. Недостатков три было, отвечайте.

Иванов В.Т., председатель:

Были указаны недостатки, просим ответить на замечания.

Владимиров В.И., соискатель:

С вашего позволения я вынес вопросы для большего удобства на слайды. Во-первых, хочу поблагодарить Сергея Николаевича за труд по оценке моей работы. И что касается первого вопроса, то да, естественно это очень правильно и грамотно сделать эти эксперименты, с различными промежуточными концентрациями кальция. Что и будет сделано в дальнейшем, но целью этой работы было показать именно общую схему взаимодействия, и проверить есть оно или нет. И эксперименты, о которых говорит Сергей Николаевич, обязательно будут сделаны, но в дальнейшем. Что касательно вопроса номер два, о том, что касается способа оценки функциональной активности. Дело в том, что кавеолин-1, как я уже говорил, участвует в регуляции достаточно многих клеточных процессов. И нельзя чётко вычленив его одну функцию, по которой можно сказать, что да если белок, допустим, взаимодействует с c-Src киназой, то он функционален, или белок транспортирует холестерин то он функционален, потому что за эти два действия отвечают совершенно разные его участки. Таким образом здесь мы выбираем домен кавеолина, N-концевой, растворимый, цитоплазматический участок, содержащий в себе многократно подтверждённый в различных исследованиях функциональный домен посредством которого идёт регуляция сигнальных белков, которыми по сути являются представители семейства НКС. Так что, мы считаем то, что мы доказали взаимодействие как с полноразмерным N-концевым доменом, так и с функциональным доменом уже служит доказательством его функциональной активности. Что касательно фолдинга, то здесь естественно были большие вопросы, которые мы решили для себя методом динамического светорассеяния. Так, как если бы это были нерегулярные структуры, склонные к агрегации или различные формы присутствовали бы в растворе, мы бы детектировали их. А так, белки имеют достаточно хороший графический профиль, и узкое массовое распределение.

Что касается третьего вопроса. Действительно, с моделированием не всё так гладко. По поводу обусловленности выбора, начнём с белков НКС. Так как мы искали общий сайт взаимодействия для всех НКС нам следовало обратить внимание на то что гомология целых аминокислотных последовательностей всех изучаемых НКС была относительно небольшой, однако гомология C-концевых доменов, которые использовались для моделирования, была значительно выше. Так, например, между рековерином и NCS1 гомология достигает 70%, то

есть это самые высоко консервативные для все НКС участок, поэтому мы использовали его. Теперь по поводу функционального домена кавеолина-1. Проводились исследования в 2015 году, в которых было показано методом ЯМР, что пептид, соответствующий нашему скорее всего, по расчетам, существует в виде β -шпильки, и авторы приводят три варианта структуры. Наша же модель так же представляет собой β -шпильку. Может быть она не идеальна, но по крайней мере она соответствует тому что уже опубликовано.

Иванов В.Т., председатель:

Всё у вас? Спасибо. Как у нас обстоят дела с удалённым доступом?

Князев А.В., оппонент:

Добрый день, меня видно, слышно?

Олейников В.А., учёный секретарь:

Да, мы вас видим и слышим.

Князев А.В., оппонент:

(излагает положительный отзыв)

Для меня большая честь, что мне разрешили оппонировать диссертацию. Она произвела на меня хорошее впечатление. Был очень подробный предыдущий отзыв. Я хотел бы сказать, что диссертация Владимирова Василия Игоревича посвящена изучению молекулярных основ функционирования системы генерации и передачи зрительного сигнала в фоторецепторной клетке позвоночных животных. Это, на мой взгляд, актуальная тема, и она мне интересна, так как у нас в институте на кафедре медицинской химии тоже многие исследования связаны с белками. То есть ещё и мой личный интерес в этой работе. Диссертация имеет классическое строение, в «Обзоре литературы» приведены данные касательно функционирования зрительной системы, роли НКС в регуляции процессов передачи сигнала, а также особенностей функционирования белков семейства кавеолинов. В экспериментальной части приведены разнообразные подходы, используемые в молекулярной биологии, биохимии и компьютерном моделировании, для изучения белок-белковых взаимодействий. Надо сказать, что уровень высокий, для исследований использовались различные методы, что говорит о высоком профессионализме диссертанта, и я думаю, в целом научной школы. Следующий раздел «Результаты и их обсуждение».

В этом разделе в первую очередь следует описание идентификации белков НКС в составе фоторецепторных рафт-структур при различных кальциевых состояниях фоторецепторной сетчатки. Далее приводятся процедуры очистки и характеристики структур N-концевого фрагмента кавеолина-1 и белков семейства НКС - рековерина, GCAP1, GCAP2 и NCS1. Вот, особый интерес вызывает разработанная в ходе выполнения диссертации методика разделения миристоилированной и немиристоилированной форм рекомбинантных НКС. Кроме этого, в работе было показано влияние взаимодействия с кавеолином-1 на функциональные свойства НКС. Важная роль отводится экспериментам с окисленными формами НКС и кавеолина-1. В целом, я подчёркиваю, работа производит хорошее впечатление, но у меня есть несколько замечаний.

Так, в качестве имитации окисленной формы N-концевого фрагмента кавеолина-1 автором была проведена аминокислотная замена Y14E, что не в полной мере соответствует фосфорилированию кавеолина-1 по Y14. Как известно, фосфорилирование кавеолина-1 ключевой процесс, влияющий на его функциональную активность, и, хотя замена на глутаминовую кислоту создаёт подобие отрицательного заряда, но она имеет отличное от тирозина химическое строение, что может оказывать значительный эффект в реализации белок-белкового взаимодействия. В частности, фосфорилирование кавеолина-1 по Y14 позволяет белку вступать в реакции, основанные на взаимодействии с SH₂ и SH₃ белковыми доменами, что, естественно не может происходить при замене Y14E.

В разделе 3.15. приведено взаимодействие различных форм N-концевого фрагмента кавеолина-1 с окисленными формами рековерина. Можно ли, основываясь на полученных данных, сделать общий вывод о влиянии окислительного стресса на взаимодействие НКС и кавеолина-1 и последствия такого взаимодействия?

Несмотря на то, что в работе показано, что окисление рековерина (*in vivo*) происходит одновременно с фосфорилированием кавеолина-1, не совсем понятно существует ли какая-либо связь между этими явлениями.

Не смотря на эти замечания, я считаю, что диссертационная работа Владимирова Василия Игоревича полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, пункты 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней» и автор диссертационной работы, Владимиров Василий Игоревич, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия.

Спасибо за внимание, извините за плохую связь.

Иванов В.Т., председатель:

Спасибо за отзыв, тем не менее функция исполнена. Хотелось бы услышать ответы на замечания оппонента.

Владимиров В.И., соискатель:

Да, спасибо большое, Александр Владимирович за отзыв, и спасибо за вопросы, которые тоже для удобства я вынес на слайд. Таким образом, касательно первого вопроса, который совпал с вопросом Алексей Анатольевича. Дело было в том, что как я уже говорил, мы ориентировались на две публикации, где на клеточных моделях было проведена аминокислотная замена в тирозине в 14 положении кавеолина-1 на фенилаланин и на глутаминовую кислоту. И в обоих работах было показано что замена на глутаминовую кислоту эквивалентна фосфорилированию кавеолина-1 поэтому мы решили её использовать. Что касательно химических свойств аминокислот и их боковых радикалов. То действительно, для взаимодействия с SH₂ и SH₃ подобными доменами абсолютно необходимо наличие тирозина, но вот в белках НКС таких участках просто нет. И таким образом мы решили, что нам больше интересен скорее заряд на N-конце кавеолина-1, как он повлияет на организацию белка, которая в свою очередь будет определять связывание с рековерином. Соответственно, что касается второго и третьего вопросов. То я их, наверное, объединю в один, так как оба они касаются окислительного стресса и последствий для изучаемых белков. Я использую картинку, которую я уже демонстрировал, но с дополнениями. Теоретически мы предполагаем, что существует два пути, по которым взаимодействие окисленных форм рековреина и кавеолина-1 может дальше реализоваться в клетке. Первое, это то что димерная форма рековреина, как было показано в нашей статье 2019 года может неспецифически ингибировать родопсинкиназу. Соответственно, это приводит к избыточной клеточной сигнализации, так как система фототрансдукции перестаёт возвращаться в релаксированное состояние, что приводит в конечном итоге, к апоптозу фоторецепторов. Таким образом, если кавеолин-1 связывает очень сильно димер рековреина, и, если эта форма локализуется на мембране рядом с родопсином. То будет происходить постоянное ингибирование киназы, и таким образом, это приведёт к апоптозу. Это один путь. Другой, теоретически возможный путь, включается в себя то что кавеолин-1 связан с транспортом белков, (посредством кавеол – небольших везикул) в аппарат гольджи и в лизосомальную систему. Причём при фосфорилировании кавеолина-1 отпочкование кавеол от мембраны значительно интенсифицируется. Так, если кавеолин-1 интенсивно

связывает окисленные формы НКС, то он может опосредовать их транспорт в эти системы, и последующую утилизацию этих окисленных форм белков. Но пока это только предположение. Всё.

Иванов В.Т., председатель:

Понятно. Значит, мы уже завершили заготовленные все этапы нашего обсуждения, переходим к общей дискуссии. Кто хочет добавить что-то к тому что мы слышали? Какие-то аргументы, за, против? Дискуссионные какие-то вопросы? Может кто-то есть на удалении, кто хотел бы участие в дискуссии принять? Они могут как-то дать об этом знать?

Олейников В.А., учёный секретарь:

Да, они просто могут включить микрофон и сказать что-то, но пока никто не хочет высказаться.

Иванов В.Т., председатель:

Ещё раз обращаю свой взор в зал. По-видимому, необходимости в дополнительных высказываниях нет. Я надеюсь, у членов учёного совета сформировалась точка зрения по поводу голосования, и тогда двигаемся дальше. Собственно, счётная комиссия уже избрана, и я даю слово диссертанту для заключительного выступления.

Владимиров В.И., соискатель:

В заключении своей работы я хотел бы выразить благодарность своему научному руководителю Зинченко Дмитрию Валерьевичу, под руководством которого я работал всё это время, по созданию кандидатской диссертации. Сотрудникам группы сигнальных систем клетки НИИ ФХБ им. Белозерского, в частности Зернию Евгению Юрьевичу, Бакшеевой Виктории Егоровне и Сенину Ивану Ивановичу, потому что они принимали самое непосредственное, само важное участие в моей работе, и помогали с планированием и проведением многих экспериментов. Так же, коллектив лаборатории новых методов в биологии, Института биологического приборостроения, Пущино, на базе которого сделаны эксперименты по физико-химической характеристике и поверхностный плазмонный резонанс. Кроме того, обязательно, рецензентам и ведущей организации за труд, по экспертной оценке, диссертации. Так же мои любимым магистрантам и студентам, благодаря которым получилось получилась вся эта эта диссертация: Анне Доктор, Меланьиной Любе, Михайловой Ирине, Авдюшкину Андрею и Лебедевой Анастасии. А

также, Щанниковой Маргарита Павловне за всестороннюю помощь, и спасибо глубокоуважаемые члены диссертационного совета за внимание, ещё раз.

Иванов В.Т., председатель:

Спасибо за лаконичное выступление. Перед тем как голосовать, последний раз задаю вопрос насчёт проекта заключения. Сергей Кириакович уже сказал своё предложение, мы его учтём. Есть какие-то ещё замечания? Нет Николая Владимировича Бовина, он обычно активно участвует в выступлении, но сейчас не тот случай. Тогда, у нас все предварительные шаги исполнены, объявляю короткий перерыв на голосование.

(Идёт тайное голосование)

Олейников В.А., учёный секретарь:

Счётная комиссия завершила свою работу. По диссертации Владимирова Василия Игоревича. Присутствовало на заседании 20 членов диссертационного совета, роздано бюллетеней – 20, оказалось в урне – 20 за – 20, против и недействительных бюллетеней нет.

Иванов В.Т., председатель:

Прошу утвердить итоги голосования. Кто за? Есть ли против?

Поздравим диссертанта с успешной защитой! И себя с тем, что в таких непростых условиях мы провели такую существенную работу. Спасибо, до следующей встречи.

Председатель
диссертационного совета



д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Учёный секретарь
диссертационного совета



д.ф.-м.н. Олейников В.А.