

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу 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».

В современном мире соединения кремния в научных и научно-технологических отраслях находят все более широкое применение. Особенно наглядно это проявляется, прежде всего, в электронике, конструировании оптических приборов, оптико-волоконной и вычислительной техники. При этом наиболее важным и необходимым свойством новых материалов на основе кремния, используемых в вышеуказанных областях, является именно упорядоченность атомов кремния, которая придает им необычные свойства. Особый интерес в этом аспекте вызывают наноструктурные формы кремниевых соединений, открывающие еще бóльшие возможности использования материалов на их основе. Однако на пути формирования такого рода упорядоченных структур на основе кремния, в силу природных свойств самих соединений кремния, возникают определенные трудности. Это, прежде всего, необходимость применения при их синтезе существенно усложненных условий реакций (например, высоких температур). В этих случаях исследователи чаще всего обращаются к примерам формирования этих структур в природных условиях, имея в виду создание в последующем биотехнологического подхода («зеленая химия») конструирования такого рода материалов.

Такой природный процесс был сравнительно недавно отмечен рядом авторов (Shimizu K. et al., 1998; Muller WEG et al., 2008), в частности, при формировании спикул губок и створок диатомовых водорослей. В литературе отмечается, что эти образования у губок обладают уникальными физико-химическими свойствами – они эффективно пропускают электромагнитное излучение (в том числе и в видимой части спектра) и обладают повышенной гибкостью по сравнению с существующими световодами на основе кварца. Обнаруженная повышенная гибкость и устойчивость спикул к упругой деформации, в основе которой лежит формирование упорядоченных структур кремнезема, привела к возможному расширению их применения. Так, потенциально, можно использовать такого рода структуры в качестве синтетических покровных материалов, а также при замещении (имплантировании) утраченных в результате травм или оперативного вмешательства фрагментов тела человека (например, части скелета опорно-двигательной системы), т.е. по ходу исследования возникает и «медицинский аспект» применения данных структур. Достаточно детальное описание применения в практической медицине мезопористых структур на основе кремнезема приведено в обзоре (U.T. Uthappa et al., 2018).

Указанные свойства спикул губок не могли не привлечь внимание широкого круга исследователей, в результате активной работы которых удалось не только описать процесс полимеризации силикатов в природе, выявить генезис появления у них упорядоченных структур на основе кремнезема, но и определить центральные ферменты (силикатеины, силаффины), принимающие участие в формировании упорядоченных структур на основе силикатов. Не менее важным оказалось и обнаружение у губок еще одной группы ферментов, являющихся своеобразными «партнерами» силикатеинов, – силиказ. Эти ферменты осуществляют деполимеризацию соединений кремния и участвуют в разрушении поврежденных спикул (Schroder et al, 2003). Эти белки являются представителями класса цинк-зависимых металлоферментов, их активность проявляется в гидролизе эфирной связи (семейство угольных ангидраз). Аналоги этих белков выявлены в силикатных бактериях и их функция заключается в гидролизе связей Si–O в кристаллических решетках глинистых минералов и Si–C в кремний-органических соединениях. Не меньший интерес представляет и продукт полимеризации

ортосиликатов – кремнезем, который обладает пористой структурой и в целом ряде случаев является даже более подходящим материалом для различных имплантантов, т.к. именно пористая структура позволяет сосудам организма прорасти внутри самого искусственного заместителя в месте поражения костной системы.

Однако, для уверенного предложения биотехнологического процесса получения и способа модификации интересующих объектов кристаллическими структурами на основе кремнезема или самим кремнеземом, необходимо было дополнительное исследование свойств указанных силикатеинов и выявление их индивидуальной роли в общем ансамбле вышеуказанных белков.

В связи с вышеуказанным, работа Поваровой Н.В. «Катализ образования кремнезема рекомбинантными силикатеинами, катепсинами и их мутантными вариантами» является не только **актуальной и своевременной, но и имеющей безусловную практическую значимость.**

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа Поваровой Н.В. изложена на 92 страницах и построена по традиционному плану, включающему Введение (стр.5), Обзор литературы (стр.6-35), Материалы и методы исследования (стр.36-52), Результаты и обсуждение (стр.54-83), Выводы (стр.84), Список работ, опубликованных по теме диссертации (стр.85), Список сокращений (стр.86), Список литературы (стр.87-92), включающий 85 ссылок. Следует отметить, что все части диссертационной работы идеологически тесно связаны между собой и информативно дополняют друг друга.

В диссертационной работе Поварова Н.В. четко определяет как **цель** всего исследования, так и **задачи**, которые она планирует решить для достижения (стр.53) сформулированной цели. Эта постановка достаточно четкая, однозначная, и полностью соответствует проведенному в работе исследованию.

Обзор литературы состоит из трех разделов и соответствует заявленной теме диссертационной работы. Первый из них полно характеризует процесс образования спикул у губок – от внутриклеточной фазы их образования, радиального роста и до внеклеточной фазы их формирования. Особое внимание Поварова Н.В. уделила роли белков, в частности, силикатеинов на всех стадиях появления и роста спикул. Обсужден процесс сборки филаментов и отмечено, что важной особенностью формирования филаментов является их полная АТФ-независимость, т.е. вся необходимая для создания филамента информация определяется самой первичной структурой и элементами пространственной структуры силикатеина. При этом гидрофобные взаимодействия приводят к образованию олигомерных форм силикатеина, которые дополнительно стабилизируются дисульфидными связями. Безусловно, учитывая тот факт, что активное исследование принципов формирования кремнезема и его кристаллических структур отдельными ферментами и комплексами белков в природных объектах, началось сравнительно недавно, составление литературного обзора не предполагало особых затруднений. Но, в данном случае, Поварова Н.В. уделила акцентированное внимание роли в процессе полимеризации ортосиликатов именно силикатеинов, как объекту дальнейшего своего исследования. В связи с этим, в раздел Обзор литературы диссертант отдельно включил подраздел Сборка филаментов, в котором подробно рассмотрены принципы мультимеризации как самих силикатеинов, так и формирования филаментов смешанного типа. Анализ этой информации имеет особую ценность, т.к. одним из возможных источников активного образования кремнезема и его кристаллических форм (на уровне наночастиц) являются именно такого рода мультимеры белковой природы.

Следует отметить также, что Поварова Н.В. отчетливо понимает, что соединения кремния обладают особыми физико-химическими свойствами и способны к самополимеризации в растворах, эффективность которой часто зависит от концентрации исходных соединений (например, неорганический ортосиликат). В данном подразделе Литературного обзора автор подробно рассмотрел участие в полимеризации ортосиликатов и их производных синтетическими

аналогами силикатеина. Анализ литературных данных показал, что в их присутствии катализ полимеризации кремнезема возможен, но процесс протекает существенно менее эффективно по сравнению с участием самих силикатеинов. При этом концентрации как самого аналога белкового катализатора, так и предшественника (ортосиликата) должна быть значительно выше (на 2-3 порядка) по сравнению с самим силикатеином. В целом, отмечено, что эффективность образования полимерных форм ортосиликатов при использовании синтетических катализаторов (декапептиды и пентапептиды на основе остатков лизина, гистидина, химерный белок катепсин-силикатеин, полипептиды полилизин-полицистеин и полилизин-полисерин) на много порядков ниже, чем с участием самого силикатеина. Но, вместе с тем, Поварова Н.В. отмечает, что в присутствии полицистеина в бескислородной среде образовывались частицы кремнезема сферической формы, а в присутствии кислорода – пластинчатые. Т.е. состав синтетических полипептидов позволяет контролировать форму полученных частиц: полилизиновый фрагмент полипептида и его длина определяет эффективность конденсации кремнезема, а нуклеофильная природа аминокислотных остатков второй части этого смешанного полипептида – форму образующегося полимерного ортосиликата. Это, действительно, любопытный факт, который тесно увязывается автором с планами дальнейших исследований.

Не менее важно, что проведенный полный анализ литературных данных позволил Поваровой Н.В. обратить пристальное внимание на катепсины – родственные белки, для которых также показана силикатеиновая активность. Полученная и хорошо проанализированная информация, предложенная в научных статьях, привела автора к вполне обоснованной центральной идее диссертационной работы: на основе всестороннего сравнительного исследования свойств этих двух типов протеиназ (силикатеинов и катепсинов), обладающих силикатеиновой активностью, выяснить не только природу этой активности в исследуемом процессе, но и показать, какие именно структурные особенности придают силикатеинам и катепсином свойство осуществлять полимеризацию ортосиликатов и какова роль как отдельных аминокислотных остатков полипептидной цепи, так и активного центра названных ферментов в полимеризации производных на основе кремния.

В разделе **Материалы и методы** Поварова Н.В. описывает экспериментальные подходы, использованные при исследовании, и их аппаратное оформление. Диссертант подробно описал клонирование фрагментов ДНК, конструирование рекомбинантных штаммов-продуцентов, способ получения и очистки как исходных белков, так и их мутантных форм. Убедительно показан контроль соответствия запланированной полученной структуры клонированных участков ДНК. В качестве подхода к определению силикатеиновой активности исследуемых ферментов Поварова Н.В. отработала колориметрическое определение содержания силиката в продуктах реакции. Приведено четкое описание биоинформатических методов обработки и анализа полученных экспериментальных данных. Однако формат преподнесения большей части информации, представленной в этом разделе, имеет существенные перекосы, неполноту информации и неточности.

1. В данном разделе полностью отсутствует список реагентов (например, солей) и их химической чистоты. Эта информация, кроме формальной благодарности фирме-производителю, порой носит принципиальный характер в получении и воспроизведении тех или иных экспериментальных результатов.

2. При описании уже давно устоявшегося способа электрофореза фрагментов ДНК в агарозном геле автор преподносит эту методику с излишней подробностью. Здесь достаточно было бы ссылки на соответствующие научно-методические материалы (например, Sambrook J. et al., 1989). В равной степени это касается и описания денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле, где таблица 4 является явно избыточной.

3. Синтез субстратов приведен без ссылок на ранее разработанный другими авторами метод получения этого(-их) соединений. Кроме того, не приведены характеристики самого(-их) полученного вещества.

4. При описании конструирования экспрессионных векторов Поварова Н.В. утверждает, что с использованием кДНК в качестве матрицы и метода ПЦР получены последовательности ДНК, кодирующие гены силикатеина A1 (LoSil) и катепсина (LoCath). В данном случае были получены фрагменты ДНК, кодирующие структурные части этих генов, а в функциональные гены (гибридные гены) они превращались лишь при их клонировании в составе экспрессионного вектора, где попадали под контроль сильного промотора РНК-полимеразы бактериофага T7.

5. Не обосновано преимущество выбора именно вектора рЕТ40(b+), структура которого предопределяет довольно специфическое его назначение, и клонирование в состав которого вынуждало автора вводить в последовательность праймеров (5'-конец) дополнительные функциональные элементы. В ряду рЕТ-векторов (www.novagen.com) предлагается довольно широкий набор плазмид, позволяющих избежать эти трудности.

6. Желательно было бы привести (в данном разделе или в Результаты и обсуждении) общую структуру сконструированных полученных экспрессионных векторов. Скорее всего, это помогло бы автору не допустить опечатку в приведенных первичных структурах рекомбинантных белков (таблица 2), где не только не указаны стартовый аминокислотный остаток (метионин), но и исчез His-Tag.

7. Поскольку силикатеины и катепсины относятся к семейству протеиназ, было бы крайне полезным оценить их протеолитические свойства. Эта характеристика полезна не только для исследования роли самого активного центра указанных ферментов в процессе полимеризации ортосиликата и его производных, но и позволила бы оценить правильность фолдинга как исходного белка, так и его мутантных форм (см. Результаты и обсуждение).

8. В подразделе Анализ цитотоксичности автор не обосновывает выбор именно культуры эукариотических клеток линии HeLa Kyoto. Данная линия представляет собой трансформированные (раковые) клетки, природа которых имеет существенные отличия в своем метаболизме от нормальных клеток. Этот факт предполагает сравнительное исследование воздействия субстратов ТЭОС, ТГЭОС или ТГС и на нормальные клетки.

9. В подразделе Выделение и очистка белков диссертант указывает (стр.46): «Затем белок элюировали раствором 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5mM DTT, pH 7.2, содержащим 200mM имидазола. Полученный препарат белка хранили не более 3 дней. Перед анализом белок переносили в требуемый буферный раствор с помощью колонок Merck Millipore или колонок PD-10 (GE Healthcare Life Sciences)». При этом, естественно, возникают вопросы: при какой температуре хранился раствор? Что происходило с данным белком через три дня? Почему нельзя было перевести белок сразу в требуемый буферный раствор(-ы)? Нельзя ли данный фермент лиофилизировать из подходящего буфера и использовать в дальнейшем? Ответов на эти вопросы автор не дает, что, по логике изложения, предполагает получение каждые три дня новой порции рекомбинантного белка.

В разделе Результаты и обсуждение Поварова Н.В. приводит как результаты, полученные в ходе экспериментов, так и проводит их анализ в тесной связи с приведенными в Литературном обзоре данными. Поскольку объектом исследования в диссертационной работе являлся фермент (прежде всего, силикатеин), то необходимо было, во-первых, подобрать (предложить) подходящий субстрат, использование которого было бы адекватно поставленной задаче. В качестве таких субстратов Поварова Н.В. предложила использовать аналоги широко известного ТЭОС (тетраэтил-ортосиликат) алкоксисиланы ТГЭОС (тетраakis(2-гидроксиэтил) ортосиликат) и ТГС (тетраглицерол-ортосиликат).

Основным преимуществом использования данных субстратов в реакциях с силикатеином является тот факт, что в этом случае заместители в производном ортосиликата несут более гидрофильный характер, по сравнению в ТЭОС, что предполагало его большую растворимость. Эти предположения успешно оправдались при непосредственном сравнительном изучении эффективности полимеризации субстратов под действием силикатеина: в присутствии всех трех исследованных субстратов образовывались частицы аморфного кремнезема, что было подтверждено сканирующей электронной микроскопией, состав которых был подтвержден с помощью элементного анализа. Немаловажно также отметить, что исследуемый силикатеин показал примерно равную активность при использовании ТГЭОС и ТГС, в то время как сравнительную величину активности фермента с использованием ТЭОС удалось достичь только повысив концентрацию субстрата примерно в два раза. Этот факт может быть отнесен как к большему сродству ТГЭОС и ТГС к силикатеину, так и нестабильности самих субстратов, склонных к самопроизвольной полимеризации в растворах. Дополнительное исследование показало, что ТГС и ТГЭОС подвергается гидролизу, причем последний наиболее подвержен этому процессу в ряду используемых субстратов. Довольно неожиданным, исходя из структуры самого субстрата, явился тот факт, что ТГС при концентрации 0,1% по своей устойчивости оказался сравнимым ТЭОС. Попыток объяснить это явление в диссертационной работе не проводится и этот результат может быть просто принят как экспериментальный факт.

На следующем этапе исследования Поварова Н.В. проверила влияние воздействия исследуемых субстратов на выживаемость клеток линии HeLa Kyoto. Убедительно показано, что ТГС является наименее токсичным из проверенных субстратов, что объяснено малой токсичностью по отношению к живым клеткам млекопитающих именно глицерина, как продукта самопроизвольного гидролиза субстрата, по сравнению с этанолом и этиленгликолем в случае ТЭОС и ТГЭОС. Полученные вышеуказанные экспериментальные данные позволили Поваровой Н.В. в дальнейших своих ограничиться исследованиях свойств силикатеина именно этим субстратом (ТГС).

Общие замечания по этому разделу диссертационной работы приведены выше в рассмотрении раздела Материалы и методы исследования. Дополнительно необходимо отметить, что ТГЭОС ранее использовался при различных исследованиях (Hoffman et al., 2002; Shchipunov Y.A., 2003), в том числе и связанных с изучением свойств силикатеинов (Shkryl Y.N., 2016; Каменев Д.Г., диссерт. работа, 2015). Однако, предложенный автором данной диссертационной работы новый субстрат – ТГС, судя по полученным результатам, имеет неоспоримые преимущества по сравнению с ТГЭОС и ТЭОС.

Получив необходимые характеристики субстратов, Поварова Н.В. приступила к исследованию непосредственно роли силикатеинов в процессе полимеризации производных ортосиликатов. Важно отметить, что основываясь на анализе литературных данных, автор сделал сознательный выбор в качестве объекта исследования именно силикатеин А1 (LoSilA) из морской губки *Latrunculia oparinae*. Это было во многом связано с тем, что, хотя первичные структуры силикатеинов из других организмов имеют достаточно высокую гомологию (75-78%) с исследуемым ферментом, изоэлектрическая точка силикатеина А1 близка к физиологической и составляет 8,4. На первом, вполне оправданным этапе исследования, Поварова Н.В. оценила кинетику полимеризации ортосиликата в системе ТГС – силикатеин А1. Встретившиеся трудности при оптимизации самого процесса и количественного анализа полученных результатов были успешно решены, в чем, безусловно, проявились лучшие качества исследователя: хорошее знание литературных данных и достаточно гибкая тактика постановки экспериментальной работы. Поварова Н.В. сделала совершенно обоснованное предположение о том, что весь процесс ферментативной полимеризации ортосиликата имеет

два независимых этапа – ферментативное образование частиц кремнезема и одновременное, самопроизвольное и независимое от белка, уплотнение их структуры (спекание).

Второй этап исследования был во многом обусловлен знаниями Поваровой Н.В. о потенциальной роли остатков цистеина как в формировании активной формы белков и ферментов за счет образования внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей, так и в возможном непосредственном участии в каталитическом акте. В структуре силикатеина А1 обнаруживаются три внутримолекулярных дисульфидных связи, более того для этого фермента в ранних исследованиях показано, что они могут принимать активное участие в олигомеризации исследуемого белка. Проведенные автором дополнительные эксперименты показали, что присутствие в реакционном растворе DTT уменьшает количество образуемых частиц кремнезема только на 20%, т.е. не отменяет весь процесс полимеризации ортосиликата. Эти данные, во многом подтвержденные и литературными источниками, указывают на отсутствие решающего влияния указанных аминокислотных остатков на функционирование фермента.

Одним из важных показателей ферментативных реакций является выявление влияния концентрации компонентов (фермент – субстрат) на эффективность всего процесса. Поварова Н.В. выяснила, что оптимальная концентрация субстрата (ТГС) составляет 0,4-0,6%, а оптимум концентрации самого фермента находится в интервале 0,06-0,1 мг/мл. Не менее важно было оценить температурный- и рН-оптимум для силикатеина А1. Диссертант вполне логично провел предварительный эксперимент по выявлению термостабильности белка и показал, что его инкубация при температурах в интервале 0 – 37^oC не оказывает влияния на ферментативную активность. Но при этом оптимальная температура для проявления силикатеином А1 ферментативной активности составила 5^oC с выраженным дополнительным повышением активности при 25^oC. Объяснения этого дополнительного возрастания в диссертационной работе не дано. При исследовании рН-зависимости активности белка автор показал, что оптимальное значение этого параметра для силикатеина А1 составляет 5,3 (Рисунок 39). Однако любопытно, что сам ТГС в условиях эксперимента оставался практически нативным. Поскольку шкала рН на рисунке 39 начинается с значения 3 единицы рН, т.е. достаточно кислая, факт стабильности субстрата (ТГС) вызывает некоторое удивление. Это удивление может усиливаться, если вспомнить способ получения самого ТГС – перэтерификация тетраэтоксисилана в присутствии смолы DOWEX 50 WX 8 (H+), т.е. фактически в кислых условиях. Почему тогда сам ТГС абсолютно толерантен к значению рН 3,0?

Совокупность изученных ферментативных свойств силикатеина А1 позволило Поваровой Н.В. провести финальное сравнение субстратов в оптимальных для фермента условиях (Рисунок 42) и дополнительно убедиться в том, что ТГС, с учетом его малой токсичности по отношению к клеткам HeLa Kyoto, является оптимальным субстратом для исследования силикатеина А1 и его родственных белков.

Полученные, описанные и проанализированные в предыдущих разделах диссертационной работы результаты, позволили Поваровой Н.В. приступить к решению наиболее интригующего вопроса о природе и механизме ферментативной активности силикатеинов и их роли в полимеризации ортосиликата и его производных. Именно эти знания, в конечном итоге, могут позволить целенаправленно получать наноматериалы с заранее заданными свойствами. Решение этого центрального вопроса автор провел с использованием изучения как мутантных форм самого силикатеина А1 (LoSil), так и родственных ему катепсинов L из губки *L. oparinae* (LoCath) и человека (CTSL), для которых также показана силикатеин-подобная функция. При этом катепсины выступали в роли своеобразных «референс-ферментов». Поварова Н.В. в предварительных экспериментах дополнительно показала, что ТГС успешно полимеризуется с образованием аморфного кремнезема ферментами LoSil и

LoCath. При этом автор отмечает, что, по литературным данным, катепсин L (CTSL) человека считался неспособным к полимеризации ортосиликатов до кремнезема. Проведенный сравнительный анализ первичных структур силикатинов и катепсинов из различных источников (Рисунок 44) позволил соискателю выявить аминокислотные остатки, замена которых могла бы прояснить их роль в формировании ферментативно активного полипептида. При этом были получены две группы мутантных форм белков: в первой группе аминокислотные остатки заменяли на «нейтральный» остаток аланина, а мутанты второй группы несли реципрокные замены, т.е. аминокислотные остатки, характерные для силикатеинов, заменяли на остатки, характерные для катепсинов, и наоборот. Следует признать, что предложенная диссертантом тактика проведения смысловых аминокислотных замен, в данном случае, является оптимальной и имеющей большой потенциал при объяснении природы ферментативной (силикатеиновой) активности в этой группе белков.

Рекомбинантные мутантные формы белков были наработаны гетерологичной экспрессией соответствующих генов в клетках *E. coli*, очищены и исследована их силикатеиновая активность (Рисунок 46). Показано, что все мутантные формы белков проявляли силикатеиновую активность. При этом осмысленность произведенных замен подтверждалась неравномерностью изменения ферментативной (силикатеиновой) активности этих форм. Например, в ряду мутантов LoSil замещение важных для фермента остатков активного центра на остаток аланина продемонстрировало сниженную, но не инактивирующую роль. Более того, вариант LoSil-KSC оказался в 3 раза активнее исходного силикатеина (LoSil). Не менее любопытным представляется и тот факт, что LoCath оказался активнее LoSil дикого типа. Все мутантные формы LoCath проявляли активность, сопоставимую с белком дикого типа, а мутанты LoCath-26W, LoCath-163A, и LoCath-GAS проявляли значительно бóльшую ферментативную активность по сравнению с исходным белком дикого типа. Впечатляет и тот факт, что при этом мутант LoCath-GAS был в 7 раз активнее LoSil. Все эти факты, безусловно, относятся к используемой паре «ТГС – фермент», но, тем не менее, разрушение активного центра фермента, не приводящее к потере силикатеиновой активности, вызывает вопрос вообще о роли этого центра в полимеризации и поликонденсации ортосиликатов и их производных.

Тщательный анализ полученных данных и первичных структур силикатеинов и катепсинов позволил Поваровой Н.В. предположить, что катепсин L человека (CTSL) может также проявлять силикатеиновую активность. Накопленный на предыдущих этапах экспериментальный опыт позволил диссертанту получить как рекомбинантный CTSL, так и его мутантные формы (Рисунок 47) и исследовать их свойства. Все предположения, высказанные автором блестяще подтвердились: все проанализированные белки, включая и мутантные формы CTSL, обладали силикатеиновой активностью (Рисунок 49). Более того, и в этом случае замены в активном центре CTSL не сказывались на проявлении белком полимеризирующей ортосиликат функции. При этом и морфология частиц кремнезема (Рисунок 48) не отличалась от соответствующих частиц, образованных CTSL дикого типа или силикатеином из морской губки.

Следует отметить, что Поварова Н.В. с большой осторожностью, присущей для уже сформированного исследователя, трактует эти результаты и указывает на то, что в условиях проявления силикатеиновой активности у изучаемых белков, аналогичную активность выявлена и у BSA, в котором вообще не обнаруживается активный центр, потенциально отвечающий за проявление протеиназной (или, как в случае исследуемых белков, силикатеиновой) активности. Этот факт, естественно, заинтересовал диссертанта и позволил высказать предположение о том, что катализ полимеризации ортосиликата до кремнезема может осуществляться не с помощью аминокислотных остатков активного центра, а за счет взаимодействия молекул ортосиликата с полярными и заряженными остатками на поверхности исследуемых белков.

Данное предположение, во многом, может иметь свое основательное подтверждение теми фактами, что ряд полипептидов (см. раздел Конденсация кремния в Литературном обзоре), далеких по своей структуре от силикатеинов и катепсинов, проявляет конденсирующую активность по отношению к ортосиликатам и их производным. Исследование структуры исходных и мутантных форм исследуемых белков с применением КД показало (Рисунок 51, Таблица 4), что тройные мутанты белков губок, превосходящие по своей каталитической активности соответствующие белки дикого типа, претерпевают существенные перестройки в элементах их вторичной структуры (α -спиральные участки). На основе этих результатов Поварова Н.В. делает вывод о том, что именно приобретение или утрата дополнительных α -спиральных участков могут увеличивать силикатеиновую активность белков, т.к. наблюдаемое значительное изменение вторичной структуры, как правило, тесно сопрягается с заметными изменениями в трехмерной структуре самих белков. Более того, такие изменения могут затрагивать и уровень экспонированности отдельных аминокислотных остатков на поверхности белка, где и может осуществляться конденсация ортосиликата с образованием аморфного кремнезема. Еще раз необходимо отметить (см. раздел Материалы и методы исследования), что соискатель, к сожалению, не отработал метод определения ферментативной (протеазной) активности силикатина и катепсина, что могло быть существенным при анализе изменений этого показателя как в исходных белках дикого типа, так и их мутантных форм. Возможно, в этом случае автор мог обнаружить роль самой ферментативной активности силикатеинов и катепсинов на более раннем этапе, что сохранило бы время для углубленного исследования в других разделах работы.

В заключение можно отметить, что автор диссертационной работы провел обширное и довольно трудоемкое исследование. **Полученные результаты, безусловно, имеют большое научное и практическое значение.** К научному значению можно отнести, прежде всего, выяснение элементов механизма проявления силикатеиновой активности как самих силикатеинов, так и катепсинов. Впервые экспериментально показана способность катепсина L человека к полимеризации ортосиликатов и их производных. Предложено использование оригинальных субстратов для изучения механизма функционирования указанных ферментов и выявлены оптимальные условия для проявления активности силикатеина. Изучение свойств мутантных форм силикатеина A1, катепсина L губки *L. oparinae*, а также катепсина L человека позволило автору впервые убедительно показать, что активный центр этих белков не играет основную функцию в проявлении ими силикатеиновой активности. **Практическая ценность работы** логично вытекает из вышеуказанной новизны и определяется, прежде всего, тем, что создана новая система субстрат (ТГС) – фермент, которая позволяет эффективно получать аморфный кремнезем *in vitro*, и создает реальные предпосылки для практического осуществления такого процесса. Поварова Н.В. не отмечает в своей диссертационной работе и ее автореферате на мой взгляд еще один очень важный вклад как в научный, так и в практический аспекты своего исследования. Ведь еще одним фактическим результатом проведенного исследования является конструирование новых, высокоэффективных биокатализаторов на основе мутантных форм катепсинов и силикатеина: LoSil-KSC (в 3 раза активнее исходного LoSil), LoCath-GAS (в 7 раз активнее LoSil), а также CTSL-187A и CTSL-25S. Эти мутантные формы исследуемых белков потенциально могут найти свое практическое применение, по крайней мере, в системе *in vitro*.

Отмеченные в данном отзыве недостатки (см. раздел Материалы и методы исследования данного отзыва) в большой степени несут характер не столько критических замечаний, а, скорее всего, пожеланий автору на будущее в планировании самой работы и оптимизации экспериментальных подходов. Эти замечания отражают только глубокий интерес оппонента к проведенному Поваровой Н.В. исследованию.

