

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание
учёной степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 28.10.2020 № 32

О присуждении **Владимирову Василию Игоревичу** ученой степени кандидата
химических наук.

Диссертация «Роль кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторной системе» по специальности 02.00.10 «биоорганическая химия» принята к защите 24.08.2020 г, протокол № 24, диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Владимир Владимирович, гражданин РФ, 1989 года рождения. В 2012 году соискатель окончил естественно-научный факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Тульский государственный университет по специальности «Химик».

В 2018 году соискатель окончил аспирантуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Пущинский государственный естественно-научный институт (ПущГЕНИ), с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь» по специальности «биологические науки». В настоящее время работает младшим научным сотрудником в филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН). Диссертация выполнена в лаборатории фармакокинетики ФИБХ РАН.

Научный руководитель - кандидат биологических наук **Зинченко Дмитрий Валерьевич**, старший научный сотрудник, заместитель руководителя лаборатории фармакокинетики ФИБХ РАН.

Официальные оппоненты: **Кочетков Сергей Николаевич**, академик РАН, доктор химических наук, профессор, зав. лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, и **Князев Александр Владимирович**, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, декан химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва (ФГБУН ИБГ РАН)**, в своем *положительном* заключении, подготовленном д.б.н., проф. Сащенко Лидией Павловной, подписанном академиком РАН Георгиевым Павлом Георгиевичем – директором ФГБУН ИБГ РАН указала, что, диссертационная работа Владимирова В.И. является завершённой научно-квалификационной работой, которая по своей новизне, актуальности и достоверности полностью соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 25.09.2013г. №842), а её автор Владимиров Василий Игоревич заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 4 работы, общим объёмом 5,2 печ.л., опубликованные в рецензируемых научных изданиях из перечня, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем учёной степени работах в диссертации отсутствуют. Работы по теме диссертации, в которые Владимиров В.И. внёс основной или значительный вклад:

1. **Vasily I. Vladimirov**, Viktoriia E. Baksheeva, Irina V. Mikhailova, Ramis G. Ismailov, Ekaterina A. Litus, Natalia K. Tikhomirova, Aliya A. Nazipova, Sergei E. Permyakov, Evgeni Yu. Zernii and Dmitry V. Zinchenko. A Novel

- Approach to Bacterial Expression and Purification of Myristoylated Forms of Neuronal Calcium Sensor Proteins. *Biomolecules* 2020, 10, 1025.
2. **Vladimirov V.I.**, Zernii E.Yu., Baksheeva V.E., Wimberg H., Kazakov A.S., Tikhomirova N.K., Nemashkalova E.L., Mitkevich V.A., Zamyatnin A.A., Lipkin V.M., Philippov P.P., Permyakov S.E., Senin I.I., Koch K-W., Zinchenko D.V. Photoreceptor calcium sensor proteins in detergent-resistant membrane rafts are regulated via binding to caveolin-1. *Cell Calcium*, 2018, V. 73, P. 55-69.
 3. Zernii E.Y, Nazipova A.A, Nemashkalova E.L, Kazakov A.S, Gancharova O.S, Serebryakova M.V, Tikhomirova N.K, Baksheeva V.E, **Vladimirov V.I.**, Zinchenko D.V, Philippov P.P, Senin I.I and Permyakov S.E. Light-Induced Thiol Oxidation of Recoverin Affects Rhodopsin Desensitization. *Front. Mol. Neurosci.*, 2019, 11, 474, P. 168-186.
 4. Zernii E.Y., Zinchenko D.V., **Vladimirov V.I.**, Grigoriev I.I., Skorikova E.E., Baksheeva V.E., Lipkin V.M., Philippov P.P., Senin I.I. Ca²⁺-dependent regulatory activity of recoverin in photoreceptor raft structures: the role of caveolin-1. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2014, V. 8(1), P. 44–49.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н., академика Кочеткова С.Н. –

положительный, содержит следующие вопросы и замечания:

1. В работе продемонстрировано влияние caveолина-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 caveолина-1 на кальций-зависимую функциональную активность НКС.

2. Принимая во внимание эксперименты, проведённые для характеристики использованных в работе конструкций N-концевого фрагмента caveолина-1, всё же следует разработать способ для оценки функциональной активности препаратов caveолина-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.

3. Предложенная в работе модель взаимодействия между caveолином-1 и рековерином так же вызывает несколько вопросов. Во-первых, отсутствие точно определённой структуры caveолина-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.

Отзыв официального оппонента д.х.н., Князева А.В. – положительный, содержит следующие вопросы и замечания:

1. 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.

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

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

Отзыв ведущей организации – положительный, в котором указывается, что недостатки работы касаются её оформления: это неудачные выражения, опечатки, иногда очень мелкие подписи к рисункам.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается наличием у них большого опыта научно-исследовательской работы в областях, близких к тематике диссертационной работы. Стоит отметить, что сотрудниками Института биологии гена РАН ведутся работы в области геной и белковой инженерии, молекулярной биологии, а также исследования межклеточных

взаимодействий. Князев Александр Владимирович является высококлассным специалистом в области физико-химической биологии, разработки новых биополимеров, для применения в медицинской практике и научной работе. Сфера научных интересов Кочеткова Сергея Николаевича чрезвычайно широка, но особо стоит отметить его достижения в области направленного конструирования нуклеотидполимераз с заданными новыми свойствами методами белковой инженерии. Кроме того, Кочетков С.Н. является ведущим специалистом в области изучения фундаментальных механизмов, лежащих в основе социально значимых вирусных инфекций. Таким образом их высокая квалификация позволяет им объективно оценить научную новизну рассматриваемой диссертации, а также теоретическую и практическую значимость её результатов

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем комплексных исследований обнаружена и охарактеризована новая регуляторная функция интегрального белка мембранных рафт-структур кавеолина-1 в отношении белков семейства НКС зрительной системы. В частности, впервые получены данные, указывающие на совместную локализацию кавеолина-1 и белков НКС в фоторецепторных клетках. Несколькими прямыми методами показано наличие взаимодействий между кавеолином-1 и белками семейства НКС, определены кинетические и равновесные параметры этих взаимодействий. Определен сайт связывания кавеолина-1 в структуре НКС. Показано влияние кавеолина-1 на Ca^{2+} -чувствительность (на примере рековерина) и другие функциональные свойства НКС, высказаны предположения о механизмах, лежащих в основе наблюдаемых эффектов. Впервые продемонстрировано влияние мутации кавеолина-1 Y14E, имитирующей фосфорилирование этого белка в условиях окислительного стресса, на его взаимодействие с НКС. 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, включающая разделение миристоилированной и немистоилированной форм этих белков.

Представленная диссертация имеет важное теоретическое значение. В ходе выполнения работы установлен новый белковый партнёр НКС – кавеолин-1, связывание с которым, по всей видимости, оказывает влияние на внутриклеточную локализацию, связывание ионов кальция и функциональную

активность этих белков. Взаимодействие НКС с кавеолином-1 является чувствительным к повышению редокс-потенциала клеточной среды, что указывает на возможность редокс-регуляции функционирования НКС. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить участие сигнальных комплексов НКС-кавеолин-1 в Ca^{2+} -зависимой регуляции функционирования зрительной системы в норме, а также в условиях окислительного стресса, сопряженного с развитием ряда офтальмологических заболеваний. Исследованные в данной работе молекулярные механизмы регуляции НКС расширяют представление о роли фоторецепторных мембран, особых мембранных доменов и их функциональных белков, в процессах клеточной сигнализации. Кроме этого, полученные результаты вносят важный вклад в понимание регуляции и функционирования большого семейства белков, модулирующих жизненно-важные процессы в нервной ткани.

Значение полученных соискателем результатов для практики подтверждается тем, что понимание механизмов, отвечающих за прием и передачу кальциевых сигналов, являющихся одними из самых распространённых типов внутриклеточной сигнализации, играет важную роль для идентификации новых терапевтических мишеней при разработке лекарственных препаратов, модулирующих активность передачи клеточного сигнала в фоторецепторных клетках. Поэтому понимание механизмов сигнальной активности комплексов НКС-кавеолин-1 может служить основой для создания новых подходов к терапии нейродегенеративных и нейроофтальмологических заболеваний.

Оценка результатов исследования выявила, что достоверность полученных результатов не вызывает сомнений и подтверждается тем, что показана воспроизводимость экспериментальных данных. Все измерения проводились на сертифицированном, современном оборудовании. Методы и подходы для проведения исследований были выбраны исходя из поставленных целей и задач, и полностью адекватны объектам исследования.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении широкого круга экспериментов, а также в последующей обработке и анализе полученных результатов. Основные результаты получены непосредственно автором. Отдельные эксперименты выполнялись совместно с сотрудниками НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва; а также, с сотрудниками Института биологического приборостроения с опытным

производством РАН, Пущино: исследование взаимодействия N-концевого фрагмента кавеолина-1 с белками НКС методом изотермической калориметрии титрования, и методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса, а так же физико-химическая характеристика N-концевых фрагментов кавеолина-1, и эксперименты по димеризации рековерина с использованием модели крыс-альбиносов.

На основании вышеизложенного диссертационный совет заключает, что диссертация Владимирова В.И. является законченной квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в развитие биоорганической химии и биохимии, и соответствует всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к кандидатским диссертациям "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650).

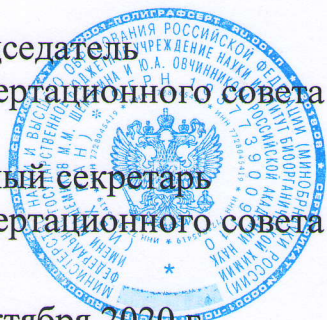
На заседании 28 октября 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Владимирову Василию Игоревичу учёную степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 6 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации 02.00.10 - биоорганическая химия, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета

29 октября 2020 г.



академик РАН Иванов В.Т.

д.ф.-м.н. Олейников В.А.