

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 28 марта 2019 г. № 5. о присуждении
Каратовской Анне Петровне, гражданство Российская Федерация, ученой степени
кандидата биологических наук

Диссертация «Иммунохимическое исследование литических ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1», по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 17 января 2019 (протокол №1) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. № 74/нк и от 10.02.2014 г. № 55/нк и с учетом переименования Совета от 30.09.2015 г. № 1166/нк.

Соискатель

Каратовская Анна Петровна (1990 года рождения) в августе 2012 г. окончила дневное отделение Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Череповецкий государственный университет» (кафедра Биологии) по специальности «Биология». В сентябре 2012 г. поступила в магистратуру Пущинского государственного естественно-научного института по направлению подготовки «Биология», которую окончила в 2014 году с квалификацией магистра. В сентябре 2014 г. поступила в аспирантуру Пущинского государственного естественно-научного института, которую окончила в августе 2018 г. с квалификацией «Исследователь. Преподаватель-исследователь».

Диссертационную работу Каратовская А.П. выполняла в лаборатории иммунохимии Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук (ФИБХ РАН), г. Пущино.

Научный руководитель:

Руденко Наталья Васильевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ РАН).

Официальные оппоненты:

Филатов Владимир Львович, кандидат биологических наук, научный сотрудник Проблемной научно-исследовательской лаборатории «Химии ферментов» кафедры Биоорганической химии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Солонин Александр Сергеевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что кандидат биологических наук, Филатов Владимир Львович является иммунохимиком, специализирующимся на разработке и применению методов детекции аналитов с использованием моноклональных антител, в частности, «сэндвич»-иммуноферментного анализа;

тем, что доктор биологических наук, Солонин Александр Сергеевич, крупный специалист – микробиолог в области исследования горизонтального переноса и регуляции экспрессии генов микроорганизмов, в изучении белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий и регуляции транскрипции в системах *in vivo* и *in vitro*, секретируемых белков-токсинов.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Каратовской А.П.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр

прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ) в своем положительном отзыве, подписанным доктором биологических наук, главным научным сотрудником лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора Фирстовой В.В. и утвержденным директором ФБУН ГНЦ ПМБ д.м.н, профессором Дятловым И.А., указала, что диссертационная работа Каратовской А.П. является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Каратовская А.П. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности - 03.01.04 Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что ФБУН ГНЦ ПМБ является признанным отечественным центром в проведении фундаментальных и прикладных научных исследований и работ в области эпидемиологии, бактериологии и биотехнологии. В лаборатории молекулярной биологии широко использует молекулярно-биологические методы для изучения бактериальных патогенов. Сотрудники ФБУН ГНЦ ПМБ, в том числе и указанной лаборатории, являются высококвалифицированными специалистами-микробиологами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Каратовской А.П.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы Каратовской А.П. изложены в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении научных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Руденко Н.В., Цфасман И.М., Латыпов О.Р., Ледова Л.А., Красовская Л.А., Каратовская А.П., Бровко Ф.А., Васильева Н.В., Степная О.А. Определение пропептидов литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 методом сэндвич-иммуоферментного анализа на основе моноклональных антител // *Биоорганическая химия*. – 2014. – Т.40. – № 3. – с.297 – 304.

2. Karatovskaya A.P., Rudenko N.V., Tsfasman I.M., Guseva K.A., Laman A.G., Bozиеv K.M., Brovko F.A., Vasilyeva N.V. Development of a method for the quantitation of homologous endopeptidases AlpA and AlpB from *Lysobacter* sp. XL1 // *Process Biochem.* – 2016. – V.51. – p.1521 – 1526.
3. Руденко Н.В., Каратовская А.П., Цфасман И.М., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Иммунохимическое определение внутри и внеклеточной локализации молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 // *Биоорганическая химия.* – 2017. – Т.43. – № 5. – с.49 – 54.

Результаты работы также были опубликованы в материалах 8 конференций и представлены на всероссийских и международных конференциях.

1. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Красовская Л.А., Васильева Н.В. Иммунохимическое определение эндопептидазы AlpA, секретируемой *Lysobacter* sp. XL1 // Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2013». – 2013. – Тула (Россия). – с.10.
2. Каратовская А.П., Чемерисова В.Н., Васильева Н.В., Красовская Л.А., Цфасман И.М., Степная О.А., Руденко Н.В. Получение и характеристика моноклональных антител к зрелой форме эндопептидазы AlpA, секретируемой *Lysobacter* sp. XL1 // XXV зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии». – 2013. – Москва (Россия). – Т.1. – с.56.
3. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Разработка тест–системы в формате сэндвич – иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител для количественного определения эндопептидазы Л1, секретируемой *Lysobacter* sp.XL1 // Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2014». – 2014. – Тула (Россия). – с.18.
4. Каратовская А.П. Иммунохимическая стандартизация лизоамидазы – антимикробного препарата нового поколения // Седьмая региональная научно–практическая конференция «Молодежные научно–инновационные проекты Московской области». – 2014. – п. Дубровицы (Россия). – с.55.
5. Каратовская А.П., Н.В. Руденко, И.М. Цфасман, К.А. Гусева, Ф.А. Бровко, Н.В. Васильева. Иммунохимическое определение внеклеточной эндопептидазы Л1 *Lysobacter* sp. XL1 // XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии». – 2015. – Москва (Россия). – с.60.
6. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Ламан А.Г, Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Разработка метода иммунохимического определения эндопептидазы Л5 *Lysobacter* sp. XL1

на основе моноклональных антител // 19 Международная Пущинская школа – конференция молодых ученых – Биология наука XXI века. – 2015. – Пущино (Россия). – с.133.

7. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Ламан А.Г., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Количественное определение высоко гомологичных эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp.XL1 на основе моноклональных антител // Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2015». – 2015. – Тула (Россия). – с.15.
8. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Ламан А.Г., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Метод сэндвич–иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител для оценки продукции фермента AlpB бактерией *Lysobacter* sp XL1 // XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии». –2016. – Москва (Россия). – с.47.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», заведующего лабораторией молекулярной микробиологии Солонина А.С. (положительный). В отзыве официального оппонента отсутствуют принципиальные замечания на диссертационную работу Каратовской Анны Петровны, однако в работе есть один недочет, а именно работа не лишена «жаргонных» (лабораторных) выражений и опечаток, что иногда затрудняет чтение работы.

Отзыв официального оппонента, кандидата биологических наук Филатова Владимира Львовича, научного сотрудника Проблемной научно-исследовательской лаборатории «Химии ферментов» кафедры биоорганической химии, биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Отзыв содержит следующие замечания:

1. Автор пишет, что эпитоп для одного из антител, использованных в тест системе для определения AlpB, доступен лишь при денатурации белка (стр. 79), в силу чего данная тест

система способна определять AlpV только в денатурированной форме. При определении содержания AlpV в культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 образец жидкости подвергали денатурации щелочью с последующей нейтрализацией. Данные, приведенные на рисунке 24 Б, свидетельствуют, что нормализованная на плотность культуры концентрация AlpV значительно превосходит уровень литической активности в пробе (биологические эксперименты после 12 часов культивирования). В работе не приведено убедительного объяснения данному факту, хотя причиной может быть присутствие части зрелой формы AlpV в неактивном состоянии.

2. В разделе «Материалы и методы» при описании условий центрифугирования автор упоминает такой параметр, как об/мин (например, стр.48 и стр.51), в то время как для успешного воспроизведения методики читателю необходимо знать относительное центробежное ускорение (*relative centrifugal force, g*).

Отзыв ведущей организации - Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ) (положительный). Отзыв содержит ряд вопросов и замечаний:

1. При выполнении диссертационной работы для выделения иммуноглобулинов класса G был использован рекомбинантный белок A, конъюгированный с агарозой («ThermoFisher Scientific Pierce», США). В тоже время хорошо известно, белок A специфически связывается с большинством подклассов IgG человека и кролика. Эффективность связывания с мышиными IgG2a, IgG2b и IgG3 низка, а с IgG1 (доминирующий подкласс в сыворотке) – практически отсутствует (Thermo Fisher Scientific Antibody Production and Purification Technical Handbook). В диссертационной работе все выделенные мышиные антитела относились к подклассу IgG1. Для выделения мышиных IgG1 антител обычно используется либо рекомбинантный белок G, либо A/G. В связи с этим возникает вопрос: какой рекомбинантный белок использовали в данной работе для очистки иммуноглобулинов мыши? Или в описании метода допущена опечатка?
2. В диссертационной работе имеется техническая неточность: Название п.2.10 в содержании «определение литической активности» (стр.3) не совпадает с названием п.2.10 «Определение бактериолитической активности» на стр.56. В соответствии с методом, описанным в п.2.10 «Бактериолитическую активность определяли турбидиметрически по уменьшению поглощения при 540 нм суспензии автоклавированных клеток *Staphylococcus aureus* 209–P». Результаты данных экспериментов в главе 3 «Результаты и обсуждение» отсутствуют.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Липкина Алексея Валерьевича, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», замечаний нет.

Сироты Татьяны Валерияновны, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории энергетики биологических систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), замечаний нет.

Виноградовой Ирины Дмитриевны, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории клостридиозов отдела бактериальных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» МИНЗДРАВА России. В отзыве имеется следующее замечание: Иммунохимическое изучение белков обычно подразумевает, в том числе и эпитопную характеристику исследуемых антигенов, однако, в автореферате такие данные не были представлены.

В дискуссии принимали участие: Бровко Ф.А., Фурсова К.К., Олейников В.А., Каприянцев А.С., Гусаков А.В.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты:**

1. Получены неперекрестные моноклональные антитела к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1: 2 против ProA, 12 против ProB, 15 против зрелой формы AlpA, 5 против зрелой формы AlpB. Для получения моноклональных антител к AlpB использовали пептиды, первичная структура которых максимально отличалась от AlpA.

2. На основе полученных моноклональных антител разработаны тест-системы в формате «сэндвич»–ИФА для количественного определения молекулярных форм эндопептидаз AlpA и AlpB.

3. Детекция иммуноблоттингом и количественный «сэндвич»–ИФА показали распределение молекулярных форм AlpA и AlpB в компартментах бактериальной клетки. AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, AlpB накапливается в периплазме для секреции в составе внешнемембранных везикул. Полученные результаты свидетельствуют о том, что окончательное созревание исследуемых ферментов

происходит в периплазме, за пределы клетки попадают только зрелые формы ферментов без пропептидов. В культуральной жидкости показан повышенный уровень продукции AlpA по сравнению с AlpB.

4. Проведена оценка количественного содержания индивидуальных ферментов AlpA и AlpB в антимикробном препарате лизоамидаза с целью его стандартизации.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

Определена топография молекулярных форм ферментов AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 внутри и за пределами клетки. Показано, что AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, фермент AlpB накапливается в периплазматическом пространстве. В качестве инструмента для иммунохимического исследования эндопептидаз AlpA и AlpB использовали высоко аффинные и специфические, не обладающие иммуноперекрестной реактивностью, моноклональные антитела. На их основе разработаны высокочувствительные тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА для количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1.

Практическая значимость заключается в том, что:

С помощью разработанных тест–систем на основе моноклональных антител возможны стандартизация и проведение контроля качества антимикробных препаратов на основе ферментов, секретируемых грамотрицательной бактерией *Lysobacter* sp. XL1 – лизоамидазы и препаратов, разрабатываемых в настоящее время с использованием рекомбинантных штаммов–продуцентов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении результатов работы лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Заключение

Диссертация Каратовской А.П. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого набора современных методов, взаимосвязанностью выводов и результатов, а также публикациями в рецензируемых журналах (3 статьи). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития биохимии белков.

На заседании 28 марта 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Каратовской Анне Петровне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 10 докторов биологических наук, 7 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета Д 002.247.01, постановил:

«За» присуждение ученой степени – 18,

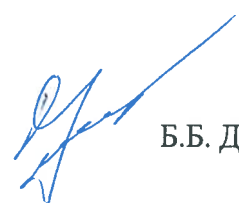
«Против» – нет,

Недействительных бюллетеней – нет,

Заместитель председателя диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

доктор химических наук, профессор



Б.Б. Дзантиев

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

кандидат биологических наук

« 28 » марта 2019 г.



А.Ф. Орловский

