

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА МГУ.015.2(МГУ.03.13)

по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

Решение диссертационного совета от «20» сентября 2022 г. № 19

О присуждении **Комаревцеву Сергею Константиновичу**, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Биотехнологическое получение секретируемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D протеазы-активатора протеина С плазмы крови» по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки) принята к защите диссертационным советом 14.06.2022 г., протокол № 18.

Соискатель **Комаревцев Сергей Константинович**, 1992 года рождения, в 2016 году окончил магистратуру биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова по направлению «Биология». В период с 01.10.2016 г. по 01.10.2020 г. проходил обучение в очной аспирантуре кафедры микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по специальности «Биотехнология». Диплом об окончании аспирантуры (№ АА 002469, рег. номер 2001-0506-0161), подтверждающий сдачу кандидатских экзаменов, выдан в 2020 г. Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова». Справка об обучении № 22/17 от 15.03.2022 г., выданная ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», подтверждает сдачу кандидатского экзамена по специальности 1.5.6. Биотехнология. В настоящее время соискатель работает в должности техника-лаборанта в лаборатории молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук».

Диссертация выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» и в лаборатории молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук». Научные руководители – кандидат биологических наук **Осмоловский**

Александр Андреевич, доцент кафедры микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», и член-корреспондент РАН, доктор химических наук **Мирошников Константин Анатольевич**, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Калебина Татьяна Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, ведущий научный сотрудник;

Кураков Александр Васильевич, доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, заведующий кафедрой микологии и альгологии;

Синеокий Сергей Павлович, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, директор,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 19 опубликованных научных работ, в том числе 11 работ по теме диссертации объемом 2,31 п.л., из них 3 статьи (объемом 1,56 п.л.), опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки):

- 1) Komarevtsev S.K., Evseev P.V., Shneider M.M., Popova E.A., Tupikin A.E., Stepanenko V.N., Kabilov M.R., Shabunin S.V., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A. Gene analysis, cloning, and heterologous expression of protease from a micromycete *Aspergillus ochraceus* capable of activating protein C of blood plasma // *Microorganisms*. 2021. 9, 1936, 1-13. WoS IF: 4.128. DOI: 10.3390/microorganisms9091936.
- 2) Комаревцев С.К., Тиморшина С.Н., Леонтьева М.Р., Шабунин С.В., Лобакова Е.С., Осмоловский А.А. Влияние иммобилизации микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D на полимерных носителях на образование фибринолитической протеазы-активатора протеина С плазмы крови // *Прикладная биохимия и*

микробиология. 2021. 57, 4, 374-379. IF RSCI (РИНЦ): 1.579. DOI: 10.31857/S0555109921030077 [Komarevtsev S.K., Timorshina S.N., Leontieva M.R., Shabunin S.V., Lobakova E.S., Osmolovskiy A.A. Effect of immobilization of the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D in polymeric carriers on the production of the fibrinolytic protease activator of blood plasma protein C // Applied Biochemistry and Microbiology. 2021. 57, 4, 475-480. WoS IF: 1.022. DOI: 10.1134/S0003683821030078].

- 3) Комаревцев С.К., Попова Е.А., Крейер В.Г., Мирошников К.А., Осмоловский А.А. Очистка протеазы-активатора протеина С плазмы крови человека, продуцируемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. 56, 1, 39-44. IF RSCI (РИНЦ): 1.579. DOI:10.31857/S0555109920010092 [Komarevtsev S.K., Popova E.A., Kreyer V.G., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A. Purification of the protease activator of protein C of human blood plasma produced by the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. 56, 1, 32-36. WoS IF: 0.886. DOI: 10.1134/S0003683820010093].

На диссертацию и автореферат поступило 5 дополнительных отзывов, все положительные.

Выбор официальных оппонентов обосновывался компетентностью в соответствующей отрасли науки и наличием публикаций в соответствующей сфере исследования. Калёбина Татьяна Сергеевна является ведущим специалистом в области молекулярной биологии и белковой химии. Кураков Александр Васильевич является ведущим специалистом в сфере микологии, в том числе биологии почвенных микромицетов. Синеокий Сергей Павлович является ведущим специалистом в области биотехнологии, в частности, в сфере исследования микробных биоресурсов в целях оценки их биотехнологического потенциала.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований выявлено что:

иммобилизация микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D увеличивает интенсивность образования протеазы-активатора протеина С плазмы крови, повышает стабильность продуцента и делает возможным его многократное использование в процессе культивирования. Комбинация фракционирования сульфатом аммония и гидрофобной,

ионообменной и гель-проникающей хроматографии обеспечивает эффективную очистку целевого фермента из культуральной жидкости продуцента;

анализ последовательности гена протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, свидетельствует о трехдоменном строении фермента и его принадлежности к группе протеиназы-К-подобных субтилизиновых протеаз;

бактериальная экспрессия целевого фермента в штамме *E. coli* BL21 в растворимой форме с последующей хроматографической очисткой на Ni-NTA-агарозе обеспечивает получение функционально активной формы протеазы-активатора протеина С плазмы крови, идентичной образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D. Для получения активного фермента в случае его экспрессии в нерастворимой форме необходимо проведение дополнительных стадий рефолдинга и созревания;

для получения исследуемой протеазы-активатора протеина С плазмы крови на различных биотехнологических производствах рекомендуется использовать одну из трех предложенных технологических схем.

Диссертационная работа Комаревцева С.К. соответствует пункту 2.1 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В.Ломоносова.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1) иммобилизация микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D является перспективным биотехнологическим подходом, позволяющим увеличить интенсивность образования протеазы-активатора протеина С плазмы крови, повысить стабильность продуцента и сделать возможным его многократное использование в процессе культивирования;

2) для очистки целевого фермента из культуральной жидкости рекомендуется использовать комбинацию фракционирования сульфатом аммония и гидрофобной, ионообменной и гель-проникающей хроматографии;

3) протеаза-активатор протеина С плазмы крови, образуемая микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, относится к группе протеиназы-К-подобных субтилизиновых протеаз. Ген исследуемого фермента имеет три коротких некодирующих участка (интрона). Кодированный участок ДНК протеазы отвечает за синтез полипептидной цепи неактивного предшественника фермента, состоящего из сигнальной последовательности, пропептидного и протеазного доменов. Фермент имеет два кальций-связывающих домена, каталитическую триаду формируют аминокислоты Asp, His и Ser;

4) активная рекомбинантная форма исследуемого фермента, идентичная по своим свойствам нативной из культуральной жидкости продуцента, может быть получена в результате бактериальной экспрессии.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, представленных в работе: анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных результатов, подготовке патентов, публикаций и научных докладов. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

На заседании 20.09.2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Комаревцеву С.К. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель

диссертационного совета

д.б.н., проф.

Нетрусов А.И.

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.б.н.

Костина Н.В.

20.09.2022 г.