

**Заключение диссертационного совета МГУ.014.4
по диссертации на соискание учёной степени кандидата наук
Решение диссертационного совета от «14» мая 2024 г. № 93
о присуждении Шапошникову Леониду Александровичу, гражданину РФ,
учёной степени кандидата химических наук.**

Диссертация «Клонирование и изучение структурно-функциональных характеристик рибонуклеозидгидролазы С (RihC) из бактерий *Limosilactobacillus reuteri* LR1», по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология принята к защите диссертационным советом «26» марта 2024 года, протокол № 88.

Соискатель Шапошников Леонид Александрович 1997 года рождения поступил на Химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» в 2013 г. и закончил его с отличием в 2019 г. В период выполнения диссертации Шапошников Л.А. с 2019 г. по 2023 г. обучался в очной аспирантуре на кафедре химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». С декабря 2023 года по настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Диссертация выполнена в группе «Генетической инженерии и белкового дизайна» на кафедре химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», а также в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители: Тишков Владимир Иванович, профессор, доктор химических наук, профессор кафедры химической энзимологии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; Пометун Анастасия Александровна, доктор химических наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», старший научный сотрудник (по совместительству) кафедры химической энзимологии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Демидюк Илья Валерьевич

профессор Российской академии наук, доцент, доктор химических наук, начальник лаборатории функциональной энзимологии Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,

Рубцова Мария Петровна

доктор химических наук, профессор кафедры химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

Жданов Дмитрий Дмитриевич

доцент, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией медицинской биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 15 опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации 4 работы, из них 4 научные статьи, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

1. Shaposhnikov L.A. et al. Ribonucleoside hydrolases – structure, functions, physiological role and practical uses / **Shaposhnikov L.A.**, Savin S.S., Tishkov V.I., Pometun A.A. // *Biomolecules*. – 2023. – V. 13. – № 1375. (объёмом 1,56 п.л., вклад автора 80%) [**Q1, JIF = 5,5**]
2. Шапошников Л.А. и др. Лактобактерии и клебсиеллы: две противоположности в борьбе за здоровье организма / **Шапошников Л.А.**, Тишков В.И., ПOMETун А.А. // *Успехи биологической химии*. – 2024. – Т. 64. – С. 143-178.
Shaposhnikov L.A. et al. Lactobacilli and Klebsiella: Two Opposites in the Fight for Human Health / **Shaposhnikov L.A.**, Tishkov V.I., Pometun A.A. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2024. – V. 89. – № S1 – P. S71-S89. (объёмом 2,25 п.л., вклад автора 80%) [**JIF = 2,8**]
3. Shaposhnikov L.A. et al. Development of an Approach to Determining Enzymatic Activity of Ribonucleoside Hydrolase C Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography / **Shaposhnikov L.A.**, Chikurova N.Yu., Chernobrovkina A.V., Tishkov V.I., Pometun A.A. // *Journal of Chromatography A*. – 2024. – V. 1715. – № 464561. (объёмом 0,5 п.л., вклад автора 60%) [**Q1, JIF = 4,1**]
4. Shaposhnikov L.A. et al. Structure-functional examination of novel ribonucleoside hydrolase C (RihC) from *Limosilactobacillus reuteri* LR1 / **Shaposhnikov L.A.**, Chikurova N.Yu., Atroshenko D.L., Savin S.S., Kleymenov S.Yu., Chernobrovkina A.V., Pometun E.V., Minyaev M.E., Matyuta I.O., Hushpulian D.M., Boyko K.M., Tishkov V.I., Pometun A.A. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25. – № 1. – P. 538-558. (объёмом 1,31 п.л., вклад автора 50%) [**Q1, JIF = 5,6**]

На автореферат диссертации поступило 4 дополнительных отзыва, все положительные.

Выбор официальных оппонентов обусловлен их высокой компетентностью и наличием публикаций в области биохимии и биотехнологии.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук является завершённой научно-квалификационной работой, в которой по результатам выполненных автором исследований содержится решение фундаментальной задачи, имеющей значение для развития отрасли знаний по биохимии, а именно: был получен новый рекомбинантный фермент RihC из лактобактерий, разработана новая методика определения его ферментативной активности, определены основные свойства, а также исследована антибактериальная активность против патогенных организмов, что является важным как с точки зрения фундаментальных исследований, так и с практической точки зрения. Содержание диссертации соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения

о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете 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) Клонированные последовательности соответствуют гену RihC из бактерий *Limosilactobacillus reuteri* LR1, при этом у клонированных последовательностей подтверждено наличие His-tag на N- или C-конце. Уровень экспрессии для фермента с His-tag на N-конце в клетках *E. coli* примерно в 3 раза больше, чем для фермента с His-tag на C-конце.
- 2) Разработанный подход определения ферментативной активности RihC и, соответственно, кинетических параметров этого фермента в настоящий момент является самым экспрессным и эффективным и подходит для изучения ферментативной активности любых ферментов семейства Rih.
- 3) Фермент RihC из *L. reuteri* к настоящему моменту имеет лучшие каталитические константы даже для наименее предпочтительных субстратов по сравнению с ферментами RihC из других организмов, причём для фермента с His-tag на N-конце каталитические константы выше, чем для фермента с His-tag на C-конце. Константы Михаэлиса не зависят от положения His-tag и согласуются с константами Михаэлиса ферментов RihC из других источников. Фермент RihC из *L. reuteri* является стабильным при повышенных температурах, инактивируется необратимо со значимой скоростью инактивации только при температурах, близких к 60°C.
- 4) Фермент кристаллизуется в виде тетрамера и содержит один ион кальция в каждой субъединице и два иона кальция в межсубъединичных контактах. Ион кальция в активном центре важен для катализа, при удалении кальция ферментативная реакция не происходит. За стабилизацию иона кальция и кольца рибозы субстрата в активном центре отвечает несколько остатков аспарагиновой кислоты и аспарагина. За стабилизацию азотистого основания субстрата отвечают остатки гистидина и тирозина. Высокие значения каталитических констант по всем субстратам, вероятно, обуславливаются большей подвижностью полипептидной цепи белка в районе центра связывания азотистого основания субстрата.
- 5) Фермент снижает эффективность образования биоплёнок некоторых патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, в том числе *K. pneumoniae*, и обладает синергизмом с меропенемом против *K. pneumoniae* и *E. coli*.

На заседании 14 мая 2024 г. диссертационный совет принял решение присудить Шапошникову Леониду Александровичу учёную степень кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 4 доктора наук по специальности 1.5.4. Биохимия и 6 докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за 14, против 0, недействительных бюллетеней 2.

Председатель диссертационного совета
д.х.н., проф., член-корр. РАН

Варфоломеев С.Д.

Ученый секретарь диссертационного совета,
к.х.н.

Сакодынская И.К.

14 мая 2024 года