

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, ПО ДИССЕРТАЦИИ **КУЛИКОВОЙ
ВЕРОНИКИ АЛЕКСЕЕВНЫ** НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 22 декабря 2017 года № 228/406

О присуждении **КУЛИКОВОЙ ВЕРОНИКЕ АЛЕКСЕЕВНЕ** (Россия)
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация **«МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПУЛОВ РИБОЗИДОВ
НИКОТИНАМИДА И НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ»**

по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

принята к защите 19.10.2017 г. (протокол заседания №226/404)
Диссертационным советом Д 002.230.01, созданным на базе Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии
Российской академии наук (ИНЦ РАН), адрес: 194064, Россия, Санкт-
Петербург, Тихорецкий просп., д. 4, утвержден приказом Минобрнауки РФ
№105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Куликова Вероника Алексеевна, 1989 года рождения, в 2013
году окончила кафедру «Биофизика» физико-механического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский
государственный политехнический университет» по направлению
подготовки «Физика», магистерская программа «Биофизика», с присвоением
степени магистра. С 31.08.2013 по 31.08.2017 проходила очную аспирантуру

в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ») – Лаборатории молекулярной микробиологии Научно-исследовательского комплекса «Нанобиотехнологии». Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры.

С 2013 года по настоящее время работает инженером в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» в научно-исследовательском комплексе «Нанобиотехнологии».

Диссертация выполнена в Лаборатории молекулярной микробиологии, НИК «Нанобиотехнологии» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Научный руководитель – Андрей Анатольевич Никифоров, кандидат биологических наук (по специальности: 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»), старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «СПбПУ».

Официальные оппоненты:

1. **Степан Петрович Гамбарян**, доктор биологических наук (по специальностям: 03.03.01 – «Физиология» и 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»), главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук», Санкт-Петербург
2. **Виктория Ивановна Буник**, доктор химических наук (по специальности: 03.01.04 – «Биохимия»), кандидат биологических наук (по специальности: 03.01.04 – «Биохимия»), ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.

Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (ПИЯФ) (г. Гатчина, Ленинградская область) в своем отзыве (заключение составлено старшим научным сотрудником Отделения молекулярной и радиационной биофизики ПИЯФ, кандидатом биологических наук (специальность 03.02.07 – «Генетика») Т. А. Штам и утверждено заместителем директора по научной работе НИЦ «Курчатовский институт» ПИЯФ, доктором биологических наук С.В. Саранцевой) указала, что диссертационная работа является завершенным научным исследованием, выполненном на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. Результаты работы обладают высокой научной актуальностью, новизной и потенциально имеют значительную практическую значимость. Работа удовлетворяет требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология», и

дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 21 опубликованную работу, по теме диссертации 18, из них 3 статьи (объемом 2,75 печ. листов.) в рецензируемых зарубежных журналах и 15 тезисов докладов на 6 международных и 9 отечественных конференциях. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных В.А. Куликовой работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. **Kulikova V.**, Shabalin K., Nerinovski K., Dölle C., Niere M., Yakimov A., Redpath P., Khodorkovskiy M., Migaud M., Ziegler M., and Nikiforov A. Generation, release and uptake of the NAD precursor nicotinic acid riboside by human cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015. 290(45): 27124-27137

Статья посвящена изучению механизмов образования рибозидов никотинамида и никотиновой кислоты в клетках человека, а также способности их выхода из клеток. Показано, что Цитозольные 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II и CN-III синтезируют нуклеозид NAR в клетках человека, в условиях повышенного уровня моонуклеотида NAMN, после чего нуклеозид NAR выходит из клеток в питательную среду. NAR, вышедший из одних клеток, эффективно поддерживает синтез внутриклеточного NAD в соседних клетках, которые не могут синтезировать NAD из других предшественников. Кроме того, в статье проведено исследование ферментативной кинетики реакций образования нуклеозидов NR и NAR из моонуклеотидов 5'-нуклеотидазами CN-II и CN-III.

2. Nikiforov A., **Kulikova V.**, and Ziegler M. The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2015. 50(4): 284-297.

В данной обзорной статье приведены последние данные о метаболизме NAD в клетках человека. Обсуждаются функции NAD в метаболических и регуляторных процессах, таких как АДФ-рибозилирование и деацетилирование белков, а также мобилизация кальция. Подробно изложены последние исследования в области биосинтеза NAD, и о компартментализации его синтеза и NAD-зависимых процессов.

3. **V. Kulikova**, L. Onopa, M. Svetlova, L. Solovjeva, D. Firsanov, K. Shabalin, K. Nerinovski, P. Redpath, M. E. Migaud, M. Ziegler, A. Nikiforov. Mechanism of nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside import into

human cells. FEBS Congress 2017 " From Molecules to Cells and Back" (September 10 - 14, 2017, Jerusalem, Israel). *FEBS Journal*. 2017. 284 (Suppl. 1). P. 370.

В тезисах международной конференции, опубликованных в рецензируемом зарубежном журнале, представлены данные, полученные соискателем, о механизмах импорта нуклеозидов NR и NAR в клетки человека. Показано, что ингибитор нуклеозидных переносчиков семейства ENT – NBTI, эффективно подавляет импорт нуклеозида NR в клетки человека. А ингибиторы нуклеозидного переносчика CNT1 влияют на транспорт нуклеозида NAR в клетки. Сделан вывод о том, что нуклеозиды NR и NAR могут транспортироваться в клетки человека с помощью переносчиков семейств ENT и CNT.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Научного сотрудника Лаборатории молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, кандидата биологических наук **Марии Вячеславовны Якуниной**. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Старшего научного сотрудника Лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток Института Цитологии РАН, кандидата биологических наук **Анны Сергеевны Цимоха**. Отзыв положительный, без замечаний.
3. Старшего научного сотрудника НИЦ «Курчатовский институт» Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, кандидата биологических наук **Дмитрия Михайловича Байтина**. Отзыв положительный, без замечаний.
4. Заведующей лаборатории динамики внутриклеточных мембран Института Цитологии РАН, доктора биологических наук, профессора, **Елены Сергеевны Корниловой**. Отзыв положительный, без замечаний.

5. Ведущего научного сотрудника Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, кандидата биологических наук, **Нatalьи Ивановны Агалаковой**. Отзыв положительный, без замечаний.

В дискуссии принимали участие:

1. Д.б.н., член корр. РАН, А.Н. Томилин, член Диссертационного совета;
2. Д.б.н., акад. Н.Н. Никольский, член Диссертационного совета;
3. А.П.Шварц, научный сотрудник Института экспериментальной медицины;
4. Д.б.н., проф., М.И. Мосевичкий, член Диссертационного совета;
5. Д.б.н., С.Ю. Хайтлина, член Диссертационного совета;
6. Д.б.н., проф., Е.С. Корнилова, член Диссертационного совета;
7. Д.м.н., проф., М.М. Шавловский, член Диссертационного совета.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области молекулярной биологии, в частности в области изучения регуляции метаболизма различных соединений, а также межклеточной сигнализации, для более объективной оценки результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований

разработан и оптимизирован метод детекции и количественного анализа метаболитов NAD в питательной среде методом ЯМР-спектроскопии. Данный метод позволил впервые детектировать выход рибозида никотиновой кислоты (NAR) из культивируемых клеток человека в питательную среду; **предложена** научная гипотеза, получившая экспериментальное подтверждение, о механизме образования нуклеозидов NR и NAR в клетках человека, а также о возможности их выхода из клеток;

доказано, что клетки человека могут конвертировать никотиновую кислоту в рибозид никотиновой кислоты NAR, который затем выходит из клеток в питательную среду. Более того, нуклеозид NAR, вышедший из одних клеток человека, может выступать в роли предшественника NAD в других клетках, неспособных использовать никотинамид и никотиновую кислоту для синтеза NAD.

установлен механизм образования нуклеозида NAR в клетках человека. Показано, что цитозольные 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II и CN-III синтезируют нуклеозид NAR в клетках человека, в условиях повышенного уровня мононуклеотида NAMN.

доказано, что импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи белков семейств ENT и CNT.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, расширяющие существующие представления о механизмах взаимопревращения метаболитов никотинамидадениндинуклеотида (NAD), а также о молекулярных механизмах межклеточного взаимодействия путем обмена ключевыми предшественниками NAD.

применительно к проблематике диссертации результативно использован широкий спектр современных методов молекулярной и клеточной биологии: культивирование и ко-культивирование клеток человека; иммуноблоттинг и иммуноцитохимия; экспрессия и выделение из бактерий рекомбинантных белков с последующим анализом их ферментативной активности с помощью ВЭЖХ и колориметрического метода; ЯМР-спектроскопия и др.

изложены новые экспериментальные данные о ферментативной кинетике реакций дефосфорилирования мононуклеотидов NMN и NAMN цитозольными 5'-нуклеотидазами человека CN-II и CN-III;

раскрыта функциональная значимость синтеза и выхода нуклеозидов NR и NAR из клеток;

Значение полученных соискателем результатов для практики подтверждается тем, что:

определены ферменты, отвечающие за образование нуклеозидов NR и NAR в клетках человека.

определены два семейства переносчиков, посредством которых нуклеозид NR и NAR могут импортироваться в клетки человека;

представлены доказательства того, что нуклеозиды NR и NAR могут не только поступать в организм с пищей, но и синтезироваться в клетках человека из других предшественников NAD, а затем экскретироваться и использоваться другими клетками для синтеза собственного NAD. Полученные данные используются в образовательном курсе «Основы молекулярной биологии», который проводится на базе НИК «Нанобиотехнологии» для студентов третьего курса кафедры «Биофизика» СПбПУ Петра Великого.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены на исправном сертифицированном оборудовании, выбор использованных методов и подходов обоснован спецификой работы и соответствует поставленным в работе задачам; показана воспроизводимость результатов исследования,

теория построена на известных, проверенных литературных данных и согласуется с опубликованными исследованиями по теме диссертации и по смежным отраслям;

идея базируется на анализе и обобщении, полученных в ходе работы экспериментальных данных, а также их сопоставлении с современными литературными данными;

использовано сравнение результатов, полученных автором, с ранее опубликованными по теме диссертации литературными данными,

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным,

использованы современные экспериментальные подходы и адекватные методы анализа данных.

Личный вклад соискателя состоит в:

активном участии в определении направлений и постановке задач исследования, выборе и обосновании подходов для их решения, а также анализе полученных результатов и формулировании выводов. Все основные эксперименты были выполнены автором лично. Автор принимал непосредственное участие в апробации полученных результатов на отечественных и зарубежных научных конференциях и подготовке публикаций по теме диссертации.

Диссертация, посвященная изучению механизмов образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов рибозидов никотинамида и никотиновой кислоты в клетках человека, является законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области молекулярной биологии, которое содержит решение научной задачи, имеющей большое значение для понимания регуляции метаболизма NAD. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных В.А. Куликовой работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Диссертационная работа по актуальности, достоверности и научной новизне полученных результатов полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №824 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

На заседании 22 декабря 2017 г. Диссертационный совет принял решение присудить **Куликовой Веронике Алексеевне** ученую степень **кандидата биологических наук** по специальности **03.01.03 – «Молекулярная биология»**.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 7 докторов по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 24 человек, входящих в состав Совета, проголосовали:

«ЗА» - 18, «ПРОТИВ» - НЕТ, недействительных бюллетеней нет.

Зам. Председателя

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

доктор биологических наук, профессор



 С.Н. Борхсениус

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

«25» декабря 2017 г.