

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА ТОПУНОВА АЛЕКСЕЯ ФЕДОРОВИЧА

на диссертацию Семеновой Марины Андреевны

**«Молекулярный механизм взаимодействия нейропротекторного белка нейроглобина
с цитохромом с»,**

**представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.**

Диссертационная работа Семеновой М.А. посвящена важной и интересной теме – взаимодействию нейроглобина (Ngb) с цитохромом *c* (Cyt *c*) и роли этого процесса в функционировании нервных клеток. Нейроглобин – гексакоординированный гемоглобин из суперсемейства глобинов. Он считается наиболее древним глобином позвоночных, что объясняет его структурно-функциональные особенности, отличающиеся от классических глобинов: гемоглобина и миоглобина. Изучение гексакоординированных гемоглобинов может прояснить ряд нерешенных вопросов эволюции глобинов. Ngb был открыт в церебральных нейронах человека и мыши в 2000 году, однако многие его свойства и особенности функционирования остаются недостаточно изученными до сих пор.

Актуальность. Нейроглобин обладает нейропротекторными свойствами, но их механизмы до сих пор неизвестны. Одна из гипотез – перенос электрона с Ngb на цитохром *c* (Cyt *c*), в результате которого Cyt *c* теряет свои проапоптотические свойства, что приводит к выживанию клетки. Поэтому изучение взаимодействия Ngb и Cyt *c* очень важно, а результаты будут иметь как фундаментальное, так и прикладное значение. Это важно и для разработки лекарственных средств для терапии нейродегенеративных заболеваний, ишемий, гипоксий и других патологий, связанных с апоптотической гибелью нейронов. Поэтому актуальность диссертационной работы М.А. Семеновой сомнений не вызывает.

Структура диссертации. Работа М.А. Семеновой составлена по обычному для кандидатских диссертаций плану. Она содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результатов и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Имеется также список используемых сокращений и список публикаций автора. Работа изложена на 119 страницах, содержит 46 рисунков, 12 таблиц, список литературы содержит 174 источника. Текст диссертационной работы соответствует всем требованиям по оформлению диссертаций.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость. В рассматриваемой диссертации был впервые предложен молекулярный механизм редокс-взаимодействия Ngb с Cyt *c*, состоящий из нескольких стадий. Для изучения взаимодействия гексакоординированных гемовых белков - Ngb и Cyt *c* был впервые применен метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). Были получены новые интересные данные о конформационных изменениях гемов в ходе переноса электрона с Ngb на Cyt *c*. Получен ряд мутантных нейроглобинов и цитохромов *c* с заменами в предполагаемой контактной зоне этих белков. Изучено влияние аминокислотных замен на взаимодействие Ngb с Cyt *c* и на конформационные параметры гема.

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о механизмах функционирования гексакоординированных гемоглобинов и их физико-химических свойствах. Показано вовлечение определенных заряженных аминокислотных остатков в формирование короткоживущего комплекса Ngb-Cyt *c*. Продemonстрирована важность конформационных перестроек гемов для данного редокс-взаимодействия, что можно экстраполировать и на другие функциональные активности гемсодержащих белков.

Работа имеет и несомненную практическую значимость. Разработаны методики изучения редокс-взаимодействий гемсодержащих белков, получения рекомбинантного Ngb и его мутантных форм. Созданы панели мутантных форм нейроглобинов и цитохромов *c*. Это будет применено в дальнейших исследованиях как Ngb и Cyt *c*, так и других гемсодержащих белков. Нейропротекторная активность Ngb в дальнейшем может быть применена для разработки лекарственных средств для терапии патологий, связанных с апоптозом нейронов. Препараты на основе Ngb могут быть востребованы в терапии болезнью Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона, инсультов, гипоксий и ишемий различного генеза.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов.

Обоснованность основных положений и выводов, полученных в диссертации, не вызывает сомнений, поскольку они основаны на необходимом и достаточном количестве фактического материала. Статистическая обработка экспериментальных данных адекватна, положения и выводы диссертации достоверны.

Содержание диссертационной работы и ее завершенность. Диссертация М.А. Семеновой соответствует всем необходимым требованиям. В разделе «Введение» диссертант формулирует цель и задачи исследования. Также во введении обоснованы актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из четырех подразделов, содержит 12 рисунков и 2 таблицы. Подраздел 1.1. посвящен общей характеристике гемсодержащих белков, с упором на свойства гема. Этот подраздел позволяет понять специфику работы с гемсодержащими белками, а также облегчает восприятие полученных экспериментальных данных. Подраздел 1.2. посвящен нейроглобину, его месту в семействе глобиновых белков, структурным и функциональным характеристикам. В подразделе 1.3. в сжатой форме описан цитохром *c*. Подраздел 1.4. содержит информацию о взаимодействии Ngb с Cyt *c*, рассмотрены гипотезы их взаимодействия с и без переноса электрона, субклеточная локализация процесса, обсуждаются модели комплекса Ngb с Cyt *c*. Особое внимание уделено проблемам в исследованиях механизмов взаимодействия Ngb и Cyt *c*. Это подводит читателя к проблематике диссертационного исследования.

В разделе «Материалы и методы» перечислены использованные в работе реактивы, хроматографические сорбенты, ферментные препараты, олигонуклеотидные праймеры, векторные конструкции, штаммы бактерий, составы ростовых сред и растворов. Описаны использованные генно-инженерные методы, получение рекомбинантных белков, методы исследования белков. Использованные методики описаны подробно и могут быть использованы как лабораторные протоколы.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из четырех подразделов и вводной части. В подразделе «Разработка схемы биосинтеза, выделения и очистки рекомбинантного нейроглобина человека в бактериальной системе» обсуждаются особенности самого белка и необходимость соответствия рекомбинантного Ngb цели и задачам исследования. Приведены первичные характеристики полученных препаратов белка (электрофореграмма, спектры поглощения, выход). Подраздел «Исследование физико-химических свойств рекомбинантного нейроглобина человека» содержит характеристику рекомбинантного Ngb, полученную с помощью классических методов (КД-, ИК-, КР-, ЯМР-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрия). Подтверждено, что рекомбинантный Ngb имеет правильную вторичную структуру, гем встроен в белковую часть корректно, дисульфидная связь в структуре Ngb присутствует. Рекомбинантный Ngb подходит для исследования его белок-белковых взаимодействий. Подраздел

«Молекулярный механизм взаимодействия нейроглобина с цитохромом *c*» посвящен исследованию методами спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния белков дикого типа – Ngb и Cyt *c*, как по отдельности, так и при переносе электрона с Ngb на Cyt *c*. Предложена авторская методика исследования редокс-взаимодействий гемсодержащих белков на основе КР-спектроскопии. С её помощью продемонстрирована специфическая реакция переноса с Ngb на Cyt *c*, которая сопровождается смещением гема Cyt *c* в гемовой впадине, изменением его плоскостной конформации и повышением конформационной подвижности гема. Заключительный подраздел «Влияние аминокислотных замен на взаимодействие нейроглобина с цитохромом *c*» содержит результаты работы с мутантными формами нейроглобинов и цитохромов *c*: их получение, характеристика с помощью общепринятых физико-химических методов и изучение влияния аминокислотных замен на перенос электрона с Ngb на Cyt *c* с применением КР-спектроскопии. Обсуждается интерпретация полученных результатов: выявлены замены аминокислотных остатков, приводящие к нарушению редокс-взаимодействия Ngb-Cyt *c*. Данные суммированы в таблице и в рядах мутантных форм, где происходит снижение способности к переносу электрона, что облегчает восприятие достаточно сложного материала. Раздел завершается схемой молекулярного механизма взаимодействия Ngb на Cyt *c*.

В заключении дано краткое обобщение полученных результатов. Выводы соответствуют поставленным задачам и выполненной работе, вполне обоснованы. Основные результаты опубликованы в 7 статьях в рецензируемых научных журналах.

Замечания к диссертационной работе. В то же время к рецензируемой диссертации можно высказать несколько замечаний.

Изучение нейроглобина интересно в том числе с эволюционной точки зрения – это действительно один из самых древних глобинов позвоночных. Однако и он входит в общее эволюционное древо глобинов, Ngb и Mb происходят от общего предка. Однако этому факту в диссертации уделено очень мало внимания.

При описании возможных функций нейроглобина стоило бы упомянуть работы группы Greenberg'a (Sun et al., 2001, 2003) по защите нейронов во время гипоксического стресса. В этих работах было показано, что при сверхэкспрессии Ngb повышается выживаемость кортикальных нейронов в случае нейрональной гипоксии.

Выводы в диссертации Семеновой М.А. сформулированы в целом четко и понятно. Однако иногда они содержат лишние слова и обороты. Например, вывод 4 начинается со слов: «На основе полученных экспериментальных данных предложен вероятный молекулярный механизм ...». Можно было бы начать прямо со слов «Предложен вероятный молекулярный механизм ...» без вступительного оборота «На основе полученных экспериментальных данных ...». Понятно, что именно на их основе был предложен данный механизм.

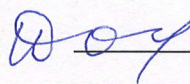
Однако указанные замечания являются техническими и не снижают общей положительной оценки рассматриваемой диссертации.

Общее заключение. На основании всего вышеизложенного можно сделать заключение, что диссертация Семеновой М.А. «Молекулярный механизм взаимодействия нейропротекторного белка нейроглобина с цитохромом *c*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой изучено взаимодействие нейроглобина с цитохромом *c*, необходимое для понимания особенностей функционирования нервных клеток в стрессовых условиях, в том числе при различных патологиях, и имеющей важное

значение для молекулярной биологии. Опубликованные печатные работы и автореферат правильно отражают содержание рассматриваемой диссертации.

По актуальности, объёму проведенных исследований, научно-методическому уровню, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов рецензируемая диссертационная работа полностью соответствует критериям (в том числе п. 9) «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции, со всеми изменениями Постановлений Правительства Российской Федерации), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор – Семенова Марина Андреевна заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук,
доктор биологических наук

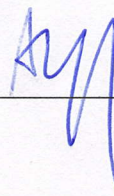
 Топунов Алексей Федорович

«21» 09 2026 г.

Адрес: 119071 г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83
E-mail: aftopunov@yandex.ru

Подпись д.б.н. Топунова А.Ф. удостоверяю.
Ученый секретарь Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, к.б.н.





Орловский А.Ф.