

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

ГОРИНА ДМИТРИЯ АЛЕКСАНДРОВИЧА

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.

1. АКТУАЛЬНОСТЬ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение механизмов нейропротекции и белков, обладающих нейропротекторными свойствами, является перспективным направлением развития в молекулярной биологии, поскольку обладает как очевидной практической, так и теоретической значимостью. Гемсодержащий белок нейроглобин способен защищать нейроны от запрограммированной клеточной гибели, однако точные молекулярные механизмы его функционирования являются малоизученными. Считается, что нейроглобин способен предотвращать запуск апоптоза за счет окислительно-восстановительного взаимодействия с проапоптотическим белком цитохромом *c*, в результате которого последний теряет способность к инициации апоптоза. Детальное понимание механизма взаимодействия нейроглобина и цитохрома *c* необходимо для будущих разработок в сфере биомедицины и биомолекулярной электроники. Можно заключить, что диссертация М.А. Семеновой, посвященная исследованию молекулярного механизма окислительно-восстановительного взаимодействия гемсодержащих белков нейроглобина и цитохрома *c*, является актуальной.

2. СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Работа М.А. Семеновой написана по традиционной схеме и включает 119 страниц машинописного текста, а также 12 таблиц и 46 рисунков. Текст диссертации написан в соответствии со всеми требованиями к оформлению работ данного типа и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», который содержит 174 ссылки.

3. НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Исследование окислительно-восстановительного взаимодействия между нейроглобином и цитохромом *c* представляет собой весьма нетривиальную задачу ввиду высокой скорости автоокисления нейроглобина и невысокой константы связывания комплекса данных белков. В диссертационной работе М.А. Семеновой впервые были использованы подходы спектроскопии комбинационного рассеяния для решения данной задачи. Более того, была разработана методика на основе спектроскопии комбинационного рассеяния, которая безусловно может быть использована для будущих исследований в области окислительно-восстановительной биологии. Диссертантом выявлены принципиально новые молекулярные детали взаимодействия нейроглобина с цитохромом *c* – конформационные перестройки гемовых групп, смещение гема *c* в гемовой щели, а также влияние точечных и множественных аминокислотных замен на исследуемое взаимодействие. Анализ всех полученных в работе данных позволил впервые предложить постадийный молекулярный механизм окислительно-восстановительного взаимодействия нейроглобина и цитохрома *c*. Полученные М.А. Семеновой панели

мутантных форм белков могут быть использованы для исследования других функциональных активностей нейроглобина и цитохрома *c*.

Практическая значимость диссертационного исследования заключается в методологических наработках как основы для будущих работ, направленных на развитие областей исследования гемсодержащих редокс-белков, молекулярных механизмов их взаимодействий с партнерами белкового и иного происхождения. Новая информация о механизмах формирования временного комплекса нейроглобин-цитохром *c* для переноса электрона между ними, полученная в обсуждаемой диссертационной работе, несомненно будет использована в дальнейших разработках биомедицинских препаратов для лечения и профилактики болезней Альцгеймера и Гентингтона, ишемий, инсультов, других патологических состояний и травм, ассоциированных с клеточной гибелью нейронов.

4. СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ И ДОСТОВЕРНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ ПОЛОЖЕНИЙ И ВЫВОДОВ

Положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе М.А. Семеновой, основаны на достаточном объеме фактического материала и полностью обоснованы совокупностью представленных данных. Достоверность экспериментальных данных сомнений не вызывает, а их статистическая обработка является адекватной.

5. ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ И ЕЕ ЗАВЕРШЕННОСТИ

Диссертация М.А. Семеновой по качеству и структурированности изложенного материала полностью соответствует стандартам. Актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, цель и задачи исследования представлены в первом разделе «Введение».

Раздел «Обзор литературы» создает основу для формулировки проблематики диссертации, в тексте подчеркиваются неизученные на настоящий момент вопросы по теме исследования, технические и иные трудности работы с изучаемыми белками и возможные пути решения проблемы. Данный раздел начинается с введения в тематику гемсодержащих белков, с фокусом на свойства и характеристики их простетической группы, а именно гема, что позволяет облегчить восприятие экспериментальных результатов и их обсуждения. «Обзор литературы» содержит ёмкое структурно-функциональное описание нейроглобина, цитохрома *c* и всю накопленную информацию, касающуюся взаимодействия нейроглобина и цитохрома *c*. Данные систематизированы в виде оригинальных иллюстраций и таблиц, что безусловно повышает их доступность.

В разделе «Материалы и методы» приведены списки использованных химических реактивов, сорбентов для хроматографии, плазмид, праймеров для мутагенеза, штаммов *E.coli*, составы культуральных сред и буферов. Методики описаны довольно подробно, так, что их воспроизводимость не вызывает сомнений.

Раздел «Результаты и обсуждение» поделен на несколько подразделов и содержит собственно результаты, полученные в работе, и их интерпретацию в виде обсуждения. Подразделы логически связаны и каждый из них завершается кратким резюмирующим абзацем. Подраздел 3.1. посвящен описанию методики получения высокоочищенных препаратов нейроглобина дикого типа, разработанной автором. В подразделе обоснован выбор бактериального штамма-продуцента, а также приведены данные по выходам и

степени очистки рекомбинантного нейроглобина. Подраздел 3.2. представляет собой характеристику полученных препаратов нейроглобина с помощью спектральных физико-химических методов (КД-, КР-, ИК-, $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрия). Общим заключением по первым двум подразделам является соответствие свойств рекомбинантного нейроглобина ожидаемым и возможность использования полученного белка для функционального исследования его взаимодействия с цитохромом *c*. Подраздел 3.3. включает в себя два смысловых блока: описание и интерпретация спектров КР и ГКР рекомбинантных нейроглобина и цитохрома *c* в растворе по отдельности и в составе предполагаемого комплекса. Выявлены пики на спектрах КР/ГКР, позволяющие отслеживать редокс-состояние белков, а также отличать сигналы от нейроглобина и цитохрома *c* при снятии спектра от их смеси. Довольно подробно описывается новая методика на основе метода КР разработанная и примененная в диссертационном исследовании. Показано, что происходит перенос электрона с гема нейроглобина на гем цитохрома *c*, что сопровождается смещением гема *c* в гемовой впадине, повышением вероятности плоской конформации гема *c*, а также повышением конформационной подвижности гема в целом. Подраздел 3.4. содержит новую информацию о влиянии аминокислотных замен на взаимодействие нейроглобина с цитохромом *c*. В работе была получена панель из восьми мутантов нейроглобина и цитохрома *c* с точечными заменами по заряженным аминокислотным остаткам, кроме того были наработаны и исследованы сконструированные ранее мутанты цитохрома *c* с множественными заменами. Мутантные белки были охарактеризованы с помощью методов КР и ГКР, с акцентом на такие параметры как жесткость белкового микроокружения, конформационная подвижность и вероятность нахождения гема в плоской конформации. Показано, что мутанты нейроглобина с точечными заменами (E60K, K67E, K95E) обладают сниженной вероятностью реализации плоской конформации гема, наблюдается снижение конформационной подвижности и увеличение жесткости их белкового микроокружения. Мутант цитохрома *c* K25E характеризуется повышенной вероятностью реализации плоской конформации гема, но сниженной конформационной подвижностью. Исследование взаимодействия редокс-пар белков дикого типа и мутантов с помощью разработанной методики позволило выявить аминокислотные замены, приводящие к нарушению переноса электрона. Это замены E60K в аминокислотной последовательности нейроглобина и K25E в цитохроме *c*. По совокупности всех полученных данных автор приводит ряды мутантных нейроглобинов и цитохромов *c* по снижению их способности к редокс-взаимодействию с белком-партнером. В конце раздела представлена иллюстрация вероятного молекулярного механизма взаимодействия нейроглобина с цитохромом *c*, состоящего из четырех стадий.

Диссертационная работа М.А. Семеновой завершается разделами «Заключение» и «Выводы». В «Заключении» автор очень кратко повторяет ход выполненного исследования и основные полученные результаты. Выводы представлены в виде четырех тезисов, которые полностью соответствуют поставленным задачам.

6. СООТВЕТСТВИЕ АВТОРЕФЕРАТА ОСНОВНЫМ ПОЛОЖЕНИЯМ ДИССЕРТАЦИИ

Автореферат диссертации оформлен по классической схеме и соответствует всем установленным требованиям, текст автореферата достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает исчерпывающее представление о содержании диссертационной работы и степени участия автора в исследованиях.

7. ВОПРОСЫ И ЗАМЕЧАНИЯ К ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ

1. Подтверждалось ли независимым методом, что восстановление гемового Fe^{3+} до Fe^{2+} с помощью НАДФН одновременно вызывает восстановление дисульфидной связи Cys46–Cys55? Допускается ли возможность, что здесь работают два самостоятельных редокс-процесса — восстановление гемового железа и тиолдисульфидный обмен?
2. Почему в рамках проверки стадии I не была исследована зависимость спектрального ответа/редокс-взаимодействия от концентрации хлорида натрия или общей ионной силы?
3. Для ряда измерений КР/ГКР приводится $n=5$ и U-критерий Манна–Уитни, однако из текста не всегда очевидно, что представляют собой пять повторностей: независимые наработки и очистки белка, разные серебряные подложки или повторные измерения одного образца?
4. Регистрация гемовых групп выполняется при использовании лазера с длиной волны 532 нм, то есть в резонансных условиях, с мощностью до 1 мВт и субмикронным пятном, то есть плотность мощности была достаточна для инициации фотохимических или локальными тепловыми эффектами. В связи с вышеизложенным вопрос: стабилен ли КР/ГКР спектр при последовательной регистрации одной и той же точки?
5. После подраздела 2.2.2.1 следует 2.2.2.3; подраздел 2.2.2.2 отсутствует.

Следует отметить, что все сделанные замечания и вопросы не умаляют значимости полученных в диссертационной работе результатов и носят уточняющий характер.

8. ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, научной новизне, актуальности темы, достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Семеновой Марины Андреевны соответствует всем критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 со всеми изменениями Постановлений Правительства РФ), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

профессор центра фотоники и фотонных технологий
Автономной некоммерческой образовательной
организации высшего образования

«Сколковский институт науки и технологий»,

профессор по специальности биофизика,

д.х.н.

«17» 09 2026 г.

Горин Дмитрий Александрович

Адрес: 121205 г. Москва, Большой бульвар, д. 30, стр. 1.

Тел. +7 (917) 207-76-30

E-mail: d.gorin@skoltech.ru

подпись д.х.н. Горина Д.А.

«Удостоверяю»

менеджер
по персоналу
Горин Д.А.

