

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук
(ИБ РАН)

ул. Институтская, д. 4, г. Пушкино, Московская обл., 142290
Тел./факс +7(495)514-02-18; факс +7(4967)318-435 E-mail: protres@vega.protres.ru
ОКПО 02699748, ОГРН 1025007773262, ИНН/КПП 5039001220/503901001

18 июня 2026 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор

Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института белка Российской академии наук

д.б.н. Колб Вячеслав Адамович



«24» июня 2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Семеновой Марины Андреевны

«Молекулярный механизм взаимодействия нейропротекторного белка нейроглобина с цитохромом *c*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

Актуальность темы исследования

Существует множество заболеваний, ассоциированных с клеточной гибелью нейрональных клеток (нейродегенеративные заболевания, острые повреждения нервной системы, спинальная мышечная атрофия, ишемии и др.), представляющих значимую социальную проблему. Следовательно, изучение молекул, обладающих нейропротекторными свойствами, а также молекулярных механизмов их функционирования, является актуальным. Одной из таких молекул является гемсодержащий глобиновый белок – нейроглобин. Несмотря на то, что нейропротекторные свойства нейроглобина были подтверждены в ряде исследований как *in vitro*, так и *in vivo*, механизмы осуществления им данной функции остаются слабо изученными. Согласно одной из гипотез, нейроглобин способен блокировать внутренний путь апоптоза за счет взаимодействия с цитохромом *c*, тем самым способствуя

выживанию нейронов. Диссертационная работа Семеновой Марины Андреевны посвящена исследованию молекулярного механизма взаимодействия нейропротекторного белка нейроглобина с цитохромом *c*. Понимание деталей механизма белок-белкового взаимодействия нейроглобина с цитохромом *c* интересно как с теоретической точки зрения, так и с практической – для дальнейшей разработки терапевтических средств на основе нейроглобина. Таким образом, диссертация М.А. Семеновой является безусловно актуальной.

Научная новизна и значимость

Впервые предложен и экспериментально подтвержден молекулярный механизм взаимодействия нейроглобина и цитохрома *c*. Для этого применена оригинальная методика на основе спектроскопии комбинационного рассеяния, позволяющая исследовать структурные особенности белок-белкового взаимодействия. Методика в дальнейшем может быть применена для исследования любых гемсодержащих белков. Получены новые данные о конформационных изменениях гемов и их белкового микроокружения, происходящих при переносе электрона от нейроглобина на цитохром *c*. Выявлены мутации, при внесении которых происходит нарушение редокс-реакции между изучаемыми белками (E60K в нейроглобине и K25E, T78S/K79P и K8E/K27E/K72E/K86E/K87E в цитохроме *c*).

Теоретическая значимость исследования М.А. Семеновой состоит в расширении знаний о гемсодержащих белках, в частности, о физико-химических свойствах и функциях нейроглобина и цитохрома *c*. В работе показана значимость точечных замен определенных аминокислот на эффективность белковых редокс-взаимодействий, а также значимость конформационных изменений гемов при переносе электрона между гемсодержащими белками.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанные методики исследования могут быть использованы при исследовании функциональной активности любых гемсодержащих белков. Кроме того, понимание механизмов нейропротекторного действия нейроглобина обладает несомненным потенциалом практического применения в качестве основы для разработки терапевтических препаратов с помощью методов белковой инженерии. Такие препараты будут очень востребованы в терапии патологических состояний, ассоциированных с апоптотической гибелью клеток.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа М.А. Семеновой изложена на 119 страницах, содержит 46 рисунков и 12 таблиц. Работа имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы из 174 источников.

Раздел «Введение» включает в себя описание актуальности и значимости диссертационной работы. Здесь же автором сформулированы цель и задачи исследования, представлены основные положения, выносимые на защиту.

«Обзор литературы» состоит из четырех глав, посвященных общей характеристике гемсодержащих белков, нейроглобину, цитохрому *c* и взаимодействию нейроглобина и

цитохрома *c*. Первая глава позволяет кратко ознакомиться с функциональным разнообразием гемсодержащих белков, а также получить представление о типах гемовых групп и их основных параметрах. Вторая глава концентрирует внимание читателя на нейропротекторном белке нейроглобине, его структуре, свойствах и функциональных активностях. Кроме того, глава содержит краткое описание семейства глобиновых белков, обсуждаются их основные отличительные особенности. Следующая глава содержит информацию о цитохроме *c*, обсуждаются его структурные и функциональные особенности, уделено внимание его белок-белковым взаимодействиям. В четвертой главе, собрана и обобщена вся актуальная на момент написания диссертации информация о взаимодействии нейроглобина с цитохромом *c*. Описаны существующие гипотезы и вероятные механизмы этого взаимодействия с переносом электрона и возможное взаимодействие без переноса электрона. А также особенности взаимодействия этих белков в цитоплазме или в межмембранном пространстве митохондрий, в норме или в условиях клеточного стресса. Отмечается наличие противоречий и неясностей в исследованиях, таким образом, становится очевидной необходимость проведения дальнейших работ для выяснения механизмов взаимодействия нейроглобина с цитохромом *c*. «Обзор литературы» проиллюстрирован 12 рисунками, а также содержит 2 таблицы, что существенно облегчает восприятие материала.

Раздел «Материалы и методы» содержит детальную информацию, включающую подробные перечни используемых реактивов, буферных растворов, векторных конструкций, олигонуклеотидных праймеров, бактериальных штаммов и питательных сред в виде списков и таблиц. Также представлены подробные описания использованных в работе методик, что гарантирует возможность использования этих методик в качестве лабораторного протокола.

В разделе «Результаты и обсуждение» подробно изложены полученные в работе данные и их интерпретация. Одним из важных результатов этой работы является разработка высокоэффективной системы биосинтеза рекомбинантного нейроглобина человека в *E. coli*, а также схема его последующего выделения и очистки.

Свойства полученного рекомбинантного нейроглобина были охарактеризованы с применением различных физико-химических методов, таких как спектрофотометрия в УФ-видимой области, спектроскопии КД, ИК, КР и ГКР, $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ЯМР, а также хромато-масс-спектрометрический анализ. На основании полученных данных был сделан вывод о соответствии свойств рекомбинантного нейроглобина интактному белку. Рекомбинантный цитохромом *c* был охарактеризован с помощью методов КР-спектроскопии, а также спектроскопии гигантского КР. В работе достаточно подробно описаны причины необходимости разработки новой методики для исследования редокс-взаимодействия между нейроглобином и цитохромом *c*, и сама методика. С помощью этой методики было показано, что между гемами окисленного цитохрома *c* и восстановленного нейроглобина протекает специфическая реакция переноса электрона, сопровождающаяся пространственным смещением гема цитохрома *c* в гемовой впадине, повышением вероятности планарной конформации гема цитохрома *c*, а также повышением подвижности пирролов и метильных радикалов гема цитохрома *c*.

На следующем этапе исследований в работе были получены панели мутантных форм белков, с заменами в предполагаемом интерфейсе взаимодействия нейроглобина с цитохромом *c*. Были исследованы их свойства как в изолированном виде, так и в составе предполагаемого комплекса при помощи спектроскопии КР. Автором показано, что

внесенные точечные замены E60K, K67E, K95E вызывают как снижение вероятности плоской конформации гема, так и снижение подвижности гема нейроглобина. Замена K25E приводит к повышению вероятности плоской конформации гема цитохрома *c*, но уменьшает его конформационную подвижность. Продemonстрировано, что введение точечных аминокислотных замен E60K (в нейроглобине) и K25E (в цитохроме *c*) приводит к нарушению редокс-взаимодействия между изучаемыми белками. Опираясь на полученные результаты автор предлагает постадийную схему молекулярного механизма взаимодействия нейроглобина с цитохромом *c*.

Раздел «Заключение» обобщает все полученные результаты. В разделе «Выводы» автор диссертации в лаконичной форме сформулировал четыре вывода. Работа Семеновой Марины Андреевны выполнена на высоком научном уровне, получены новые данные, расширяющие знания о молекулярном механизме взаимодействия нейропротекторного белка нейроглобина с цитохромом *c*.

Список работ, опубликованных в рецензируемых журналах по теме диссертации, содержит шесть экспериментальных статей и одну обзорную работу. В пяти публикациях диссертант является первым автором (включая авторство с равным вкладом), что указывает на его основной вклад в проведенные исследования.

Замечания к работе

К замечаниям можно отнести некоторые неточности и ошибки в тексте. Например, рис.1 в работе подписан «Функциональное разнообразие гемсодержащих белков». Уместнее было бы подписать «Реакционная активность группы гема разных белков». Другой пример: рис.24 подписан как «Поверхности электростатических потенциалов ...» (но у потенциалов нет поверхностей). Подразумевалось, что изображены поверхности белков, раскрашенные согласно их электростатическим потенциалам. В тексте часто используется слово «мутация» в случаях, когда правильнее использовать выражение «аминокислотная замена».

Кроме текстовых замечаний, к работе есть вопрос. По спектрам КД в дальней УФ области белки Ngb с замнами K67E и K95E максимально отличаются друг от друга. По данным других методов эти белки похожи как на белок дикого типа, так и между собой. Как это можно объяснить?

Заключение

Отмеченные недостатки не имеют принципиального характера и никоим образом не уменьшают значимости и ценности диссертационной работы и не влияют на её результаты и выводы. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, а результаты работы опубликованы в 7 рецензируемых статьях в авторитетных научных журналах. 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.

Отзыв обсужден и одобрен на открытом семинаре группы спектроскопии белка Института белка РАН (Протокол № 7 от 17 июня 2026 г.).

Руководитель группы спектроскопии белка

ФГБУН Института белка РАН

д. ф.-м. н.



Мельник Богдан Степанович

142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 4, +7 (495) 514-02-1,
bmelnik@phys.protres.ru

Подпись заверяю:

Ученый секретарь ФГБУН Института белка РАН

к.б.н.



Никонова Екатерина Юрьевна