

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Медведевой Марии Витальевны
на тему: «S-нитрозилирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы»
по специальности 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия»**

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД, КФ 1.2.1.12) играет важнейшую роль во многих процессах (в первую очередь в гликолизе) клеток как прокариот, так и эукариот. Этот фермент был одной из первых NAD(P)⁺-зависимых дегидрогеназ (наряду с алкогольдегидрогеназой, лактатдегидрогеназой и малатдегидрогеназой), для которого в 70-х годах прошлого столетия была установлена кристаллическая структура. В связи с важной и многообразной физиологической ролью ГАФД в течение многих десятилетий является предметом самых активных исследований, но до сих пор ряд очень важных аспектов остается невыясненным. К этим проблемам относится и исследование механизма нитрозилирования фермента, которое сопровождается многочисленными изменениями в клетке, в том числе к изменению локализации в клетке и даже инициирует апоптоз. Анализ представленных данных позволяет сделать безусловный вывод, что актуальность диссертации не вызывает сомнений по нескольким причинам. Во-первых, она имеет важное фундаментальное значение, поскольку информация о механизмах S-нитрозилирования ГАФД и особенно о связи

этой модификации с окислением и глутатионилированием фермента очень противоречива. Во-вторых, все указанные модификации связаны с окислительным и нитрозативным стрессами и, следовательно, имеют прямое отношение к возникновению и развитию различных патологических состояний. Таким образом, в работе гармонично сочетаются актуальные фундаментальные и прикладные аспекты.

Диссертационная работа Медведевой М.В. построена по классической схеме. Она включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты исследований и их обсуждение, Заключение, Выводы и Список цитируемой литературы. Кроме того, в работе представлен список использованных сокращений, что безусловно сильно помогает в ознакомлении и анализе диссертации. Работа изложена на 188 страницах текста и хорошо иллюстрирована 55 рисунками и 7 таблицами. Список литературы включает 204 ссылки.

Во Введении автором адекватно раскрыта актуальность исследования, его новизна и научная ценность.

В Обзоре литературы подробно разобраны все аспекты, связанные со структурой и свойствами глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. По этой теме опубликовано огромное количество работ, но автору удалось выделить наиболее важные сведения, касающиеся данной работы. Кроме того, автором наиболее подробно разобраны посттрансляционные модификации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, причем именно те, которые были

изучены в диссертационной работе. В отдельном важном разделе рассмотрено взаимодействие глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы с актином, которое привлекало внимание многих исследователей, поскольку оно участвует в компартиментализации этой дегидрогеназы и других ферментов гликолиза. Такая компартиментализация важна для регуляции гликолиза в разных типах клетках и для сопряжения отдельных путей энергетического обмена. Обзор иллюстрирован 8 рисунками. В целом количество ссылок вполне достаточно. Из 204 публикаций более 50 статей опубликованы в последние 10 лет, что свидетельствует об отличном знании диссертантом современной ситуации в области проводимых исследований.

По Обзору литературы и Списку литературы есть несколько замечаний. К сожалению, в соответствии со сложившейся в последнее время традицией, за пределами обзора остались классические работы австралийских ученых, изучавших роль взаимодействия гликолитических ферментов, включая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, со структурными белками мышц (например, Clarke FM, Masters CJ. On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1975 Jan 13;381(1):37-46). Следовало бы также упомянуть работы группы Б.Ф. Поглазова в этой области. Ссылки на статьи в отечественных журналах (например, в журнале «Биохимия») следовало бы давать в русскоязычном и англоязычном вариантах. В Списке имеются забавные опечатки. Например, в ссылке 158 фамилия одного из авторов

написана следующим образом- «Milzani/snm>». Кроме того, в Списке литературы в диссертациях принято указывать сокращенные названия журналов, в данной работе приведены полные названия. Также в последние годы во многих ведущих журналах в ссылках указывают индекс DOI, что существенно облегчает и ускоряет поиск интересующей ссылки.

Раздел «Материалы и методы» написан очень хорошо и достаточно подробно. Именно этот раздел показывает, что для решения поставленных задач был использован широкий спектр разнообразных современных методов. Особо следует отметить, что применение биоинженерных методов позволило выделить рекомбинантные формы фермента (дикого типа и мутантные), обладающие высокой каталитической активностью. Авторы подошли к выделению с классических энзимологических позиций и выделили ферменты без применения каких-либо «тэгов», получения телец включения и т.д., избежав стадий денатурации и ренатурации. Удельная активность полученных ферментов соответствует значениям, характерным для нативного фермента из тканей млекопитающих, и в несколько раз превышает удельную активность коммерческих препаратов рекомбинантных форм фермента. Правильное сворачивание рекомбинантной ГАФД было подтверждено результатами рентгеноструктурного анализа. Особенно хотелось подчеркнуть наличие в этой главе раздела, посвященного статистической обработке экспериментальных данных. Подробное описание методов исследования,

данное в этом разделе, позволяет убедиться в надежности и достоверности полученных диссертантом результатов.

Описание результатов, данное в последующих главах, производит благоприятное впечатление, как по значимости полученных данных, так и по форме их изложения. Результаты понятны, хорошо иллюстрированы и адекватно обсуждены. Наиболее значимым представляется результат, касающийся S-нитрозилирования ГАФД. Диссертант прямыми методами идентифицировал продукты модификации ГАФД оксидом азота и установил соотношение между S-нитрозилированной формой и S-сульфенированной формой ГАФД, образующейся в результате гидролиза ГАФД-SNO. Было также доказано, что модификации происходят по каталитическому остатку Cys152. Важное наблюдение заключается в том, что модификация оксидом азота не только вызывает инактивацию ГАФД, но и приводит к появлению новой ацилфосфатазной активности, катализируемой цистеин-сульфеновой кислотой, возникающей в активном центре фермента. Сравнительный анализ S-нитрозилированной и S-глутатионилированной ГАФД показал, что, хотя обе модификации оказывают на фермент сходное воздействие, S-нитрозилированная легко денитрозилируется, в отличие от деглутатионилирования S-глутатионилированного фермента. Нельзя исключить, что разные модификации каталитического цистеинового остатка ГАФД играют важную роль в регуляции активности фермента в условиях окислительного

и нитрозативного стрессов. Интересны наблюдения о взаимодействии ГАФД с разными формами актина и, особенно, о возможности транснаитрозилирования актина в присутствии ГАФД-SNO. Нельзя исключить, что транснаитрозилирование, осуществляемое ГАФД, может регулировать полимеризацию актина, участвуя тем самым в различных физиологических и патологических процессах.

По экспериментальной части диссертационной работы есть несколько дискуссионных вопросов. На мой взгляд, работу по нитрозилированию актина в присутствии S-NO-формы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы следовало бы продолжить, сделав попытку показать нитрозилирование в актине прямым методом идентификации S-NO-группы как это было сделано в случае S-нитрозилированной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

Высказанные в отзыве замечания носят рекомендательный характер и не умаляют ценности интересного и важного исследования, проведенного Медведевой М.В.

Достоверность и значимость полученных Медведевой М.В. результатов обусловлена грамотным использованием современных биохимических методов исследования, проведением экспериментов на современном сертифицированном оборудовании, а также разумным планированием экспериментов и адекватной оценкой полученных результатов.

Выводы диссертационной работы Медведевой М.В научно обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам. Они полностью подтверждены полученными результатами. Сами результаты не вызывают сомнений в объективности и достоверности. Статистическая обработка данных проведена корректно с использованием современных методов.

В целом, результаты диссертационной работы характеризуются высокой степенью новизны и имеют существенную теоретическую и научно-практическую значимость.

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, хорошо обоснованы и полностью подтверждены приведенными экспериментальными результатами. Особо следует отметить хорошие публикации Медведевой М.В. - 3 экспериментальные статьи опубликованы в международных журналах первого квартиля. Кроме того, опубликовано 3 обзорных статьи.

Диссертация Медведевой М.В отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.1.10. – «Биомеханика и биоинженерия» (по биологическим наукам), а именно, инженерии белков, разработке принципов модификации и создания белков с ценными свойствами, протеомике, фолдингу белков, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно требованиям Положения о совете

по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Медведева Мария Витальевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. – «Биомеханика и биоинженерия».

Официальный оппонент:

профессор кафедры химической энзимологии химического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова»
профессор, доктор химических наук,

Тишков Владимир Иванович

22 .ноября.2024

Контактные данные:

тел.: +7 (977) 809-96-77; e-mail: vitishkov@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.15 — Кинетика и катализ

Специальность, по которой официальным оппонентом
получено звание профессора: 03.00.04 — Биохимия

Почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3,
ГСП-1,

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова», Химический факультет

Отдел делопроизводства: телефон: (495) 939-16-71, факс: (495) 932-88-46
email: press@chem.msu.ru

Подпись профессора ~~д.х.н.~~ Тишкова В.И. удостоверяю

