

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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»

Диссертационная работа М.В. Медведевой посвящена установлению механизма S-нитрозилирования глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) и определению последствий окислительного и нитрозативного стресса для взаимодействия ГАФД с другими клеточными белками.

Роль оксида азота (NO) как биологического модулятора открыта сравнительно недавно. Бурный рост числа публикаций по этой теме, который наблюдался в 90-е годы, продолжается до наших дней. Это свидетельствует о сохраняющемся интересе к NO, наличии многих нерешенных вопросов и возможности новых открытий. Развитие исследований в этой области приводит к открытию новых мишеней NO, модификация которых влияет на важнейшие процессы жизнедеятельности. В диссертационной работе М.В. Медведевой рассматривается химический механизм модификации сульфгидрильных групп каталитически важного остатка цистеина ГАФД под действием NO с идентификацией продуктов реакции. Второе важное направление работы состоит в определении последствий нитрозилирования ГАФД для клеточного апоптоза. Оба направления исследования находятся на передовом крае современной науки.

Диссертационная работа М.В. Медведевой построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, экспериментальная часть с описанием методов и материалов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, основные результаты и выводы, список литературы. Работа изложена на 187 страницах, иллюстрирована 55

рисунками и 7 таблицами. Список цитируемой литературы включает 204 наименования.

Во введении показана актуальность работы, сформулированы ее цели и задачи, отражена ее новизна. В обзоре литературы М.В. Медведева рассмотрела публикации по всем аспектам, затронутым в её работе. Приведено общее описание общей структуры ГАФД, строение активного центра, каталитические активности и их роль в регуляции метаболизма. В отдельной части рассмотрены посттрансляционные модификации ГАФД по остатку цистеина (окисление, нитрозилирование и глутатионилирование) и их связь с апоптозом. Приведены также данные по взаимодействию ГАФД с актином. В экспериментальной части приведены использованные методы получения и характеристики ГАФД мышц кролика и рекомбинантной ГАФД человека и ее мутантного варианта. Спектр методов очень широк и включает методы разделения белков, измерения активностей ГАФД, электрофорез, иммуноблоттинг, иммунопреципитацию, иммуноферментный анализ, дифференциальную сканирующую калориметрию, спектроскопию кругового дихроизма, масс-спектрометрию MALDI-TOF и с электрораспылением, культивирование клеток на подложке и в жидкой среде, подсчет числа клеток, проточную цитометрию, рентгеноструктурный анализ белка, биоинформатические методы, методы статистического анализа и другие.

М.В. Медведевой идентифицированы продукты модификации остатка цистеина ГАФД оксидом азота - S-нитрозильное и S-сульфенильное производные фермента. Показано, что данные модификации инактивируют фермент и дестабилизируют его структуру. Показано также, что в клетке нитрозилирование ГАФД вызывает цепочку превращений: нитрозильное производное превращается в сульфенильное, которое затем образует смешанный дисульфид с глутатионом. Доказано образование S-сульфенированных и далее S-глутатионилированных ГАФД и бета-актина в культуре клеток НЕК 293Т человека в присутствии донора NO и образование комплекса этих белков. Очень неожиданно и поэтому интересно обнаружение

реакции транснаитрозилирования в комплексе нитрозилированной ГАФД с актином.

Полученные результаты представляют интерес как в фундаментальном аспекте, так и в плане их применения для конструирования лекарственных препаратов в медицине. Научные результаты диссертации, а также методические подходы могут быть в дальнейшем использованы для выполнения фундаментальных исследований в области биоинженерии, биоорганической химии и клинической биохимии в высших учебных заведениях и научно-исследовательских организациях. Все полученные результаты являются новыми и имеют приоритетный характер в части клеточных эффектов нитрозилирования ГАФД. Выполненный автором анализ экспериментальных данных и сделанные выводы полностью соответствуют полученным в работе результатам. Автореферат полностью отражает основное содержание и выводы работы.

Достоверность и научная значимость результатов подтверждается их публикацией в 6 статьях, из них 5 в международных журналах квартиля Q1 по данным Web of Science и/или Scopus. Работа прекрасно оформлена. В целом, диссертационную работу М.В. Медведевой можно считать образцовой.

Замечаний по сути работы нет, есть только мелкие замечания стилистического характера:

1. Обычно не принято вносить в экспериментальную часть элементы результатов, в частности, указывать для чего был использован тот или другой метод. Поэтому заголовки разделов 5, 6 и 9 главы «Методы» были бы более уместны при описании результатов.

2. «Инактивация в присутствии NO» не совсем точно, лучше «инактивация под действием NO», чтобы сообщить, что NO и вызывает инактивацию, а не просто присутствует. Вместо «активность ГАФД в присутствии NO» точнее писать «активность ГАФД, модифицированной NO», поскольку фермент преинкубировали с NO, а потом сильно разбавляли.

3. Обратимость - это термодинамическое свойство процесса (не вещества) (заголовок раздела 6.1 «Методов»). Экспериментальное проявление обратимости в результате некоторого воздействия – это «обращение» реакции.

4. В заголовках (например, разделы 6.1, 6.2, 6.3 и 9.2 главы «Методы») слово «исследование» чаще всего лишнее или подменяет более точные слова (измерение, определение, характеристика и т.п); вместо «человеческий белок» лучше писать «белок человека»; в выводе 4 слово «сравнение» не соответствует смыслу предложения; численные значения следует округлять до значащих цифр (табл. 2–4).

Указанные замечания ни в коем случае не имеют принципиального характера и не умоляют сколько-нибудь существенно научной значимости диссертационной работы. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.1.10. – «Биомеханика и биоинженерия», а именно ее направлению «Инженерия белков, разработка принципов модификации и создания белков с ценными свойствами, протеомика, фолдинг белков (Биологические науки)», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова; диссертация оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

На основании изложенного можно сделать вывод, что соискатель Медведева М.В. несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10 «Биомеханика и биоинженерия».

Официальный оппонент:

Официальный оппонент:

доктор химических наук, заведующий отделом химии белка НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

БАЙКОВ Александр Андреевич

10 ноября 2024 г.

Контактные данные оппонента:

тел.: +7(916)582 6901, e-mail: baykov@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.10 – Биоорганическая химия

Адрес места работы: г. Москва, ул. Хохлова, д. 1, стр. 40, корп. А
НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова». Тел.: 7(495)9395359; e-mail: fxb@belozersky.msu.ru

Подпись А.А. Байкова заверяю

и.о. директора

научно-исследовательского института

физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Московского государственного университета

имени М.В. Ломоносова

член-корреспондент РАН