

ОТЗЫВ

официального оппонента о работе **Бурковой Евгении Евгеньевны «Протеомный анализ белковых комплексов и экзосом плаценты человека»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия.

В молоке, в икре некоторых организмов, для которых такие исследования проводили, в плаценте, как временном органе, содержатся супрамолекулярные структуры в виде белковых комплексов с молекулярным весом, достигающим 1 МДа и размером до 50 нм. Также в этих жидкостях и тканях обнаружены мицеллярные структуры с размером до 100 нм, которые относятся к классу экзосом. Считается, что такие структуры могут выполнять важные клеточные и внеклеточные функции. Однако, несмотря на активные исследования, состав и свойства, как белковых комплексов, так и плацентарных экзосом исследованы недостаточно полно. В первую очередь задача по исследованию свойств этих структур осложняется получением очищенного препарата. В большинстве исследований используется смесь всех внеклеточных везикул, а также совыделяющихся белков, что приводит к неправильной интерпретации результатов о составе данных структур, а также возникновением зависимости свойств препарата от процедуры очистки.

Актуальность работы Бурковой Е. Е. определяется как раз тем, что в ней проведена разработка протокола выделения высокоочищенных экзосом плаценты человека, который включает комбинацию ультрацентрифугирования, ультрафильтрации, гель-фильтрации и аффинной хроматографии. Также в ходе работы были получены препараты высокомолекулярного белкового комплекса из экстракта плаценты человека. Анализ всех фракций на каждом этапе очистки проводили методом просвечивающей электронной микроскопии, который позволил определить как природу разделяемых компонентов, так и чистоту получаемых препаратов.

На следующем этапе выполнения работы автором проведен анализ белкового состава высокоочищенных препаратов и высокомолекулярного белкового комплекса и экзосом. Для этого в случае комплексов подбирали условия денатурации, а полученную смесь разделяли методом гель-фильтрации либо на фильтрах с различной пропускной способностью, а также проводили одно и двумерный гель-электрофорез. Все фракции гель-фильтрации использовали для масс-спектрометрического анализа, кроме того из гелей вырезали полосы для последующей масс-спектрометрической идентификации соответствующих белков.

Показано, что высокомолекулярный белковый комплекс содержит белки и пептиды с молекулярными массами от 4 до 180 кДа. В составе комплекса были идентифицированы 14 белков. При этом установлено, что в состав комплекса входит большое число пептидов с

низкой молекулярной массой 4–13 кДа. Впервые показано, что белковый комплекс содержит РНК. Экзосомы плаценты также содержат не более 15 основных белков, а также в них обнаружено 27 пептидов с молекулярной массой 2–12 кДа.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что высокомолекулярный белковый комплекс обладает девятью каталитическими активностями: ДНКазной, РНКазной, АТФазной, фосфатазной, протеолитической, амилитической, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностей. Кроме того, в работе проведено исследование влияния стабильных белковых комплексов плаценты на рост и пролиферацию клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, клеток множественной миеломы человека RPMI 8226, клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, мышечных фибробластов линии LMTK. Установлено, что белковый комплекс обладает цитотоксическими свойствами.

Таким образом, в целом данная работа посвящена исследованию состава и свойств стабильных мультибелковых комплексов и экзосом плаценты человека, а полученные результаты вносят существенный вклад в понимание биологической роли этих структур.

Представленная работа написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, экспериментальной части, приложений 1-4, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 161 страницах и содержит 41 рисунок и 10 таблицы. Библиография включает 360 литературных источника.

Обзор литературы включает детальное описание строения и функций плаценты, как временного органа. В обзоре подробно описаны данные об известных белках и их функциях в составе плаценты, а также подробно представлены данные об экзосомах, включая их состав, структуру, секрецию, механизмы взаимодействия с клетками. Автором проведен детальный анализ существующих методов выделения экзосом. В целом обзор литературы хорошо написан, он расставляет акценты на понимании цели работы и ее задач, описанных во введении.

Раздел материалов и методов включает подробное описание использованных методов. Необходимо отметить, что методически это очень насыщенная работа: хроматографические методы, гель-фильтрация, микроскопия, одномерный и двумерный гель-электрофорез, в том числе с окрашиванием серебром, масс-спектрометрия, включающая пробоподготовку, вырезание полос из геля и трипсинолиз. В работе также использовали флуоресцентное титрование, определение различных типов каталитической активности, проводили работу с несколькими линиями эукариотических клеток. В тех случаях, когда в этих работах участвовали другие сотрудники лаборатории, или сотрудники других подразделений – это четко и ясно отражено в тексте. Использование в работе такого разнообразия методов – это, безусловно, сильная сторона данной диссертации.

Многообразие использованных подходов исследования и экспериментальных методов позволяет разделить полученные результаты на две большие части: анализ белковых комплексов и анализ экзосом. Каждая из этих частей также подразделяется на разделы, которые, например, описывают очистку, микроскопию, масс-спектрометрию и т.д. Все указанные выше результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы.

Заключение диссертации описывает обобщенную совокупность полученных результатов. Выводы диссертационной работы корректны и полностью обоснованы полученным экспериментальным материалом.

В целом, полученные в данной работе результаты, несомненно, являются значительным шагом по определению состава, функций и биологической роли стабильных мультибелковых комплексов и экзосом плаценты человека.

Работа опубликована в 4 научных статьях в зарубежных журналах, 3 из которых индексируются в базах Scopus и Web of Science. Материалы работы также были представлены на 4 международных и 11 российских конференциях.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работ по данному вопросу.

По написанию диссертации имеется несколько замечаний.

1) При масс-спектрометрическом анализе фракций стабильного белкового комплекса плаценты человека в случае некоторых белков/пептидов с низкой молекулярной массой было обнаружено нескольких очень близких сигналов. Для интерпретации результатов автор предполагает, что $\Delta m/z$ может отражать различный уровень гликозилирования анализируемых белков и пептидов, а также потерю различных аминокислотных остатков. Действительно, гликозилирование является посттрансляционной модификацией белков, и является важным для стабилизации структуры и биологических функций некоторых белков. Однако в силу того, что состав гликанов может быть различным, так как их основными структурными единицами в гликопротеинах являются N-ацетилгексозамин, гексозы (манноза, галактоза), дезоксигексозы (фукоза), сиаловые кислоты (N-ацетилнейраминовая кислота), уроновые кислоты (например, гексуроновые) и т.д., то по результатам лишь масс-спектрометрических данных предположения о наличии гликозилирования тем или иным остатком являются недостаточно обоснованными.

2) Автором впервые установлено, что высокомолекулярный белковый комплекс содержит РНК длиной 770 нуклеотидов. В работе высказано предположение о том, что данный фрагмент РНК вносит вклад в высокую стабильность высокомолекулярного белкового комплекса плаценты, вероятно, за счет нековалентных взаимодействий. Тем не менее, представляет интерес идентифицировать последовательность этого фрагмента РНК, что позволит

сделать заключение, как о его структурной роли, так и возможной функциональной роли, например при осуществлении каталитической активности или цитотоксичности.

В целом необходимо отметить, что текст диссертации написан хорошим русским языком, а имеющиеся в работе единичные мелкие опечатки, неудачные формулировки, конечно, не носят принципиального характера и не влияют на общую высокую научную значимость полученных автором результатов и сформулированных выводов.

Подводя итог, необходимо отметить, что, без сомнения, результаты работы служат важнейшим шагом в изучении состава, функций и биологической роли стабильных мультибелковых комплексов и экзосом плаценты человека. Данные, полученные в работе, представляют значительную ценность для биоорганической химии, молекулярной биологии, биохимии и смежных наук.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, и оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах, а ее автор, Евгения Евгеньевна Буркова, без сомнения, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия.

Доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории
исследования модификации биополимеров
федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук



Кузнецов Никита Александрович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН). Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
Тел.: +7 (383) 363-51-74, e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

17 июня 2020 г.

Подпись Кузнецова Н.А. заверяю
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.х.н.



Пестряков П.Е.