

ОТЗЫВ

официального оппонента **Кусайкина Михаила Игоревича** на
диссертационную работу

Бурковой Евгении Евгеньевны

на тему «Протеомный анализ белковых комплексов и экзосом плаценты человека», представленную на соискание **ученой степени кандидата биологических наук** по специальности **03.01.04 – биохимия**

Работа Бурковой Евгении Евгеньевны посвящена исследованию стабильных белковых комплексов и экзосом плаценты человека. У стабильных белковых комплексов, содержащих различные пептиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты появляется полифункциональность, в настоящее время такие мультибелковые комплексы плаценты до конца не изучены. Состав и свойства плацентарных экзосом, несмотря на многолетние исследования, изучены фрагментарно, поскольку в большинстве работ используется смесь всех внеклеточных везикул, а также совыделяющихся с ними белков, что приводит к получению неточных результатов. Систематическое изучение экзосом и стабильных белковых комплексов плаценты является важным шагом в исследовании функциональных особенностей плаценты человека, которые реализуются на надмолекулярном уровне. Учитывая эти соображения, задачи, поставленные в диссертационной работе, следует признать весьма актуальными.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, насчитывающего 360 названий и четырех приложений. Работа изложена на 161 странице, содержит 41 рисунок и 10 таблиц.

Обзор литературы посвящен изложению имеющихся сведений о строении и функциях плаценты, особое внимание уделяется описанию белков плаценты, а также биогенезу, составу и методам выделения экзосом. Обзор литературы написан достаточно подробно для того, чтобы ввести читателя в

тему исследования. Раздел «Материалы и методы» содержит описание использованных в работе методов, объем изложения позволяет воспроизвести все описанные методики. Нет никаких сомнений, что диссертант владеет большинством описанных методов, позволяющих выделять и характеризовать белки, определять некоторые виды ферментативной активности. Раздел «Результаты и их обсуждение» описывает полученные результаты, которые обсуждаются с привлечением данных современной литературы. Эту часть можно условно разделить на две части, первая из которых посвящена изучению стабильного белкового комплекса плаценты человека, а вторая – исследованию плацентарных экзосом.

В первой части работы из экстракта плаценты человека был впервые выделен стабильный белковый комплекс с молекулярной массой около 1000 кДа. Показано, что белковый комплекс остается стабильным при высоких концентрациях органических растворителей, солей и детергентов. Изучен его белковый состав, комплекс содержит, по крайней мере, 14 различных белков. Также была проведена впечатляющая работа по анализу малых белков и пептидов, входящих в стабильный белковый комплекс. С помощью метода MALDI TOF MS в составе комплекса обнаружено несколько пептидов различной молекулярной массы. Показано, что комплекс обладает ДНКазной, РНКазной, АТРазной, фосфатазной, протеолитической, амилолитической, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностями. Очевидно, что эта часть работы является хорошим фундаментом для дальнейших исследований в этом направлении.

Во второй части работы описываются результаты исследования белкового состава экзосом, полученных из плаценты человека. С помощью комбинации методов ультрацентрифугирования, ультрафильтрации, гель-фильтрации и аффинной хроматографии диссертанту удалось получить высокоочищенные препараты экзосом, что является впечатляющим

результатом. Было показано, что в состав экзосом входит довольно ограниченное количество различных белков. С помощью MALDI TOF масс-спектрометрии было идентифицировано 15 белков, причем рецептор интерлейкина-1 и ферритин были обнаружены впервые в составе экзосом плаценты.

В целом, экспериментальная часть работы производит очень хорошее впечатление как по общему объему проведенной работы, так и по достигнутым результатам.

Диссертация заканчивается выводами, в которых автор формулирует основные результаты своей работы.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 4 статьях, неоднократно докладывались на международных конференциях и получили высокую оценку научной общественности.

Содержание автореферата Е.Е. Бурковой полностью отражает существо диссертационной работы. Цель, задачи, положения, выносимые на защиту, заключение и выводы полностью соответствуют сделанным в диссертации.

Вместе с тем, общее положительное впечатление от работы несколько смазывается небрежностью ее оформления: в тексте диссертации и автореферата встречаются многочисленные опечатки. Имеются и небольшие вопросы, касающиеся сути работы. Следуя совету диссертанта на странице 46 диссертации, постараюсь относиться ко всем описанным данным очень критически и не только в части исследования экзосом.

1. На рис. 1 и в тексте указывается, что по данным гель-фильтрации стабильный белковый комплекс имеет молекулярную массу 924 ± 60 кДа, а судя по данным, приведенным на рис. 8 молекулярная масса того же самого комплекса лежит в районе 2000 кДа.
2. Автор утверждает, что некоторые связи комплекса являются

устойчивыми к действию различных агентов, которыми пытались разрушить этот комплекс. В качестве доказательства приводится рисунок 8, на котором видно, что пик, соответствующий исходному комплексу, уменьшился, но не исчез полностью. Однако, это может свидетельствовать о том, что часть комплекса, после воздействия разрушающих агентов осталась в первоначальном виде. Если бы комплекс частично разрушился, его молекулярная масса бы изменилась, что было бы заметно. В связи с этим, требуется пояснение автора.

3. На рис. 16 приведены несколько масс-спектров, однако, разобраться в них очень сложно, поскольку часть стрелок указывает на пустое место, какие-то пики подписаны, другие же, такой же или большей интенсивности проигнорированы. Требуется пояснение, где конкретно на рис 16 Б автор видит сигнал с m/z 78732 или 28408, на рисунке 16 Д область, от m/z 8000 и до конца шкалы больше похожа на базовую линию и разглядеть дискретные сигналы практически невозможно.
4. Небольшой вывод, который сформулирован на стр. 87 диссертации и выделен курсивом, хотелось бы видеть с какими-то количественными данными. Интересно было бы посмотреть, какое количество белков, входящих в состав комплекса функционирует свободно, а какое в составе комплекса.

Сделанные замечания несколько не влияют на общую высокую оценку работы Бурковой Евгении Евгеньевны.

Таким образом, по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Бурковой Е.Е. «Протеомный анализ белковых комплексов и экзосом плаценты человека» отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и

фундаментальной медицины СО РАН к кандидатским диссертациям. Рассматриваемая диссертация полностью соответствует паспорту специальности 03.01.04 – биохимия (биологические науки), а также требованиям п. 2.1 – п. 2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Оформление диссертации выполнено согласно Приложениям № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации Буркова Евгения Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Доктор биологических наук, доцент Кусайкин Михаил Игоревич
Заместитель директора по научным вопросам ТИБОХ ДВО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН
Почтовый адрес: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159
Телефон: (423)231-23-60
Адрес электронной почты: mik@riboc.dvo.ru
Наименование организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН)

15 июня 2020 г



Подпись Кусайкина Михаила Игоревича заверяю
Учёный секретарь ТИБОХ ДВО РАН
к.б.н. Куриленко Валерия Валерьевна

