

3 - ЛЮТ 2021

Вх. № 109/03-07
4 Гі Карлове Акад

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Меженської Ольги Олександровни “НОВІ ПРОТЕЙНОВІ МІШЕНІ ДІЇ ТІАМІНУ І ЙОГО ПОХІДНИХ В НЕРВОВІЙ ТКАНИНІ”, представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 “Біохімія”.

Сучасний етап розвитку біології характеризується поглибленим вивченням протеому клітини та структурних основ функціонування макромолекулярних комплексів на рівні інтерактому, будови та механізмів регуляції функціональної активності протеїнів в комплексах. Встановлення структурної організації протеїнових комплексів дозволяє вияснити молекулярні основи їх функціонування, дії на окремі білки біологічно активних молекул, зокрема вітамінів, та створити передумови для спрямованого дизайну ефективних модуляторів активності протеїнів-мішень в таких комплексах. Подібні дослідження дозволяють в перспективі перейти до широких узагальнень відносно природи міжбілкових взаємодій в макромолекулярних комплексах, впливу біологічно активних молекул на функціонування таких комплексів та розуміння молекулярних механізмів цілого ряду патофізіологічних процесів, які обумовлені порушеннями взаємодій в цих комплексах.

Особливо слід відзначити важливість вивчення механізмів функціонування вітамінів та їх дій на протеїни-мішенні в організмі, що є актуальною проблемою сучасної біохімії. Досить згадати важливу роль вітаміну D₃ в забезпеченні захисту організму від коронавірусних інфекцій. При вивченні молекулярних механізмів дії вітамінів важливо також вивчати можливі нові протеїнові мішенні. В останні

роки в таких дослідження ефективним є застосування методів комп'ютерного моделювання структури протеїнів, їх міжмолекулярних комплексів та комплексів з біологічно активними речовинами. В зв'язку з цим, дисертаційна робота О.О.Меженської, присвячена пошуку нових протеїнових мішеней дії тіаміну та його похідних в нервовій тканині, безсумнівно є актуальною та повністю відповідає сучасним тенденціям в розвитку сучасної біохімії.

Дисертаційна робота О.О.Меженської побудована по класичному плану. Дисертація містить такі розділи: анотація, зміст, список використаних скорочень, вступ, огляд літератури (складається з двох глав), матеріали та методи досліджень, результати та їх обговорення, узагальнення, висновки, список використаних джерел (362 найменування) та трьох додатків, включно зі списком публікацій здобувача. Дисертацію викладено на 230 сторінках друкованого тексту, загальна кількість ілюстративних матеріалів у роботі – 15 таблиць та 37 рисунків. Експериментальній частині дисертаційної роботи передує детальний літературний огляд. В огляді представлено дані щодо властивостей молекули тіаміну і його природних та штучних біологічно активних похідних. Узагальнено сучасні уявлення відносно механізмів участі тіаміну у функціонуванні клітин нервової тканини за норми та за умов розвитку процесів нейродегенерації. Приведено детальний аналіз протеїнів, здатних зв'язуватися з тіаміном, їх ролі в транспортуванні тіаміну та реалізації його біохімічних функцій. Матеріал, викладений в огляді літератури, свідчить про високу наукову ерудицію дисертанта та здатність до критичного аналізу і узагальнення фактичного матеріалу.

В розділі “Матеріали і методи дослідження” експериментальної частини дисертантом детально описані використані експериментальні та теоретичні методи. Синтез афінних сорбентів проведено за безпосередньої участі здобувача з деякою модифікацією. Для визначення концентрації ліганду у складі афінного сорбенту використовували тіохромний метод. При дослідженні протеїнів, що

проявляють спорідненість до тіаміну, афінній хроматографії піддавали екстракт протеїнів, отриманих з ацетонового порошку мозку щурів. В цих експериментах використовували білих щурів-самців масою 100- 120 г. Дослідження проведено без порушень загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами згідно до відповідних національних та міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт. Дослідження ефектів тіаміну на ізольовані шляхом афінної хроматографії ензими проводили в специфічних умовах максимізації ефектів, визначених у попередніх дослідженнях на комерційних препаратах та мітохондрійних екстрактах. Електрофоретичне розділення протеїнів проводили по Леммлі з використанням 10-15% розділяючого поліакриламідного гелю. Після електроперенесення протеїнів мемброму інкубували з відповідними первинними антитілами в оптимальних концентраціях (поліклональні антитіла кроля, специфічні до Агріну або LRP4). Процедуру 2D-електрофорезу для розділення ізозимів МДГ, афінних до тіаміну, проводили з використанням приладу для ізофокусування протеїнів Protean IEF Cell. Мас-спектри отримували на MALDI-TOF- мас-спектрометрі Voyager DE PRO («Applied Biosystems», США). Ідентифікацію протеїнів за наборами значень мас пептидів після трипсинолізу проводили з використанням онлайн-ресурсу Mascot. Статистична обробка результатів проведена на належному рівні і всі отримані результати є достовірними. В цілому, можна зробити висновок, що дисертаційна робота виконана на високому методичному рівні з застосуванням найбільш сучасних експериментальних підходів. В роботі дисертантою використані доступні біоінформатичні ресурси ClustalO (UniProt), ClustalW від ExPASy (Swiss Institute of Bioinformatics) та спеціалізовані програми PyMOL та Jalview. Для 3D-вирівнювання протеїнів використано біоінформаційний ресурс Sequence & Structure Alignment (The Protein Data Bank). Комп'ютерний докінг тіаміну до протеїнів, виявлених з використанням мас-спектрометрії в елюатах з

тіамінвмісного афінного сорбенту, виконувався за допомогою спеціалізованої програми AutoDock Vina (версія 4.2), а також пакетів програм MGLTools та Discovery Studio

Власні експериментальні та теоретичні дослідження дисертантки свідчать, що нею виконана велика за обсягом робота, яка повністю відповідає меті і задачам дослідження. Експериментальна частина дисертаційної роботи О.О.Меженської відзначається внутрішньою логікою на всіх етапах її виконання.

В дисертаційній роботі дисертантом вперше успішно вирішена проблема ідентифікації ряду протеїнів, що здатні специфічно зв'язуватися з тіаміном і реагують на забезпеченість клітин тіаміном. В перспективі це має важливе значення для остаточного з'ясування молекулярних механізмів системної нейротропної дії тіаміну. Показано *in vitro* активуючий вплив тіаміну та тіамін дифосфату на етаповані з тіамін-вмісного афінного сорбенту протеїни, що проявляють малатдегідрогеназну та глутаматдегідрогеназну активності. Ідентифіковано ізозими малатдегідрогенази та деякі мінорні протеїни зі складу комерційного препарату МДГ, здатні зв'язуватися з тіаміном, зокрема: МДГ1В та МДГ2, декілька NAD-залежних дегідрогеназ, а також протеїни Ubiquitin-conjugating enzyme E2 та лінгвальна ліпаза LipF. Шляхом масспектрального аналізу протеїнів з екстрактів нервової тканини, що специфічно зв'язуються з т-АС, визначено варіанти протеїнів, що можуть бути складовими препарату ТЗБ, зокрема, протеїни LRP4 і Agrin. Вестерн-блот аналізом підтверджено, що протеїни LRP4 та Agrin входять до складу препарату ТЗБ. Вміст цих протеїнів в тканині мозку критично знижується за умов аліментарного дефіциту тіаміну і частково відновлюється при одноразовому введені тваринам високої дози тіаміну.

Для інтерпретації експериментальних результатів автором в дисертаційній роботі проведено молекулярне моделювання та аналіз моделей просторової

будови. Завдяки комбінації методів комп'ютерного моделювання виявлені найбільш вірогідні моделі, які узгоджуються з експериментальними даними. Визначено амінокислотні залишки протеїнів Агрін та LRP4, які відповідають за взаємодію з тіаміном, що підтверджено і МС-аналізом протеїнів в елюатах з ТАС. Отримані результати дають підстави вважати, що зв'язування тіаміну з протеїнами комплексу Agrn-LRP4 є необхідним для підтримання функціонального стану нАХР, зокрема, для стабілізації комплексу в процесі збирання кластеру рецептора.

Отже, в цілому дисертаційна робота О.О. Меженської є цільним і завершеним науковим дослідженням, в якому успішно вирішені поставлені перед дисертантом задачі. Отримані в дисертаційній роботі результати вказують на високий професійний рівень дисертанта. Основні висновки дисертаційної роботи є достатньо аргументованими і відповідають представленаому експериментальному матеріалу. Всі отримані в дисертаційній роботі висновки мають як фундаментальне значення і розширяють уявлення про молекулярні механізми функціонування тіаміну та тіамінзвязуючих білків. Автореферат дисертації адекватно відображає зміст дисертації, основні положення та висновки. Матеріали дисертації повністю відтворені в наукових публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на наукових форумах.

Принципових зауважень до дисертаційної роботи та до її висновків немає. Проте є ряд питань дискусійного характеру, на які бажано отримати відповідь.

1. Так, на стор.21 дисертації написано: “Досліджені на цей час властивості тіамінзвязуючих білків наводять на думку, що це може бути сукупність протеїнів, які здатні утримуватися разом на всіх етапах виділення препарату. Це цілком можливо через наявність в молекулі тіаміну цілого ряду хімічно активних угруповань - гідроксистильної, аміногрупи

піримідинового компонента, четвертинного азоту, лабільної сірки тіазолієвого циклу, що зумовлює високу реакційну здатність молекули вітаміну В₁. На думку рецензента більш вірогідно, що ця сукупність протеїнів в комплексі утримується за рахунок специфічних білок-білкових взаємодій.

2. При проведенні комп'ютерного моделювання варто використовувати кілька веб-серверів чи програм, які базуються на різних принципах моделювання. Ще ефективніше використовувати мета-сервери, які вже включають кілька різних комп'ютерних програм. Це дозволить отримати більш однозначні результати при моделюванні.
3. В тексті дисертаційної роботи є ряд невдалих виразів: стор.4 : Для лінгвальної ліпази малатдегідрогеназна активність показана біоінформативно за гомологією; стор.5 : Агрін – правильно: агріну ; стор.6 : тіаїна - правильно: тіаміна; стор.18: Біоінформативний аналіз - правильно: Біоінформатичний (або біоінформаційний) аналіз.

Проте висловлені зауваження не знижують цінність та важливість отриманих у дисертаційній роботі результатів.

ВИСНОВОК ОПОНЕНТА: Дисертаційна робота Меженської Ольги Олександрівни “НОВІ ПРОТЕЙНОВІ МІШЕНІ ДІЇ ТІАМІНУ І ЙОГО ПОХІДНИХ В НЕРВОВІЙ ТКАНИНІ” є завершеною науковою працею на актуальну тему, пов’язану з дослідженням молекулярних основ функціонування тіаміну . Вважаю, що дисертаційна робота за своюю актуальністю, об’ємом і значимістю отриманих результатів повністю відповідає вимогам ВАК України до кандидатських дисертацій , а її автор - Меженська Ольга Олександрівна безумовно заслуговує присудження

наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 -
"Біохімія".

1 лютого 2021 р.

Завідувач відділу білкової інженерії і біоінформатики
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор

О.І.Корнелюк

