

Отзыв официального оппонента

д.б.н Лазарева Василия Николаевича на диссертационную работу

Вавилова Никиты Эдуардовича на тему:

«Детекция низкопредставленных белков 18 хромосомы методами таргетной протеомики»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.4 – «Биохимия»

Протеомика – постгеномная (или «омиксная») технология, позволяющая изучать белковый состав биологических объектов, а также модификации и структурно-функциональные свойства белковых молекул. Проект «Протеом человека» стартовал в 2010 году на международном конгрессе HUPO в Сиднее. Впоследствии был предложен хромосомоцентричный проект, направленный на идентификацию всех белков, закодированных в геноме человека. Однако в современной протеомике остро стоит проблема чувствительности при анализе сложных биологических образцов, поскольку белки в клетках и тканях находятся в разных концентрациях, различающихся иногда более чем на шесть порядков.

Работа Вавилова Н.Э. посвящена поиску факторов, лимитирующих детекцию белков в протеомных методах анализа и разработке методов для высокочувствительной масс-спектрометрической детекции низкокопийных белков, кодируемых генами 18 хромосомы человека.

Диссертационная работа Вавилова Н.Э. изложена на 112 страницах и содержит 36 рисунков и 4 таблицы, построена по стандартному принципу и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

Диссертацию предваряет глава «Введение», в которой автор коротко подчеркивает актуальность и необходимость проведения настоящего исследования, ставит цели и задачи предстоящей работы, дает определения объекту и предметам исследования, указывает основные положения, выдвигаемые на защиту, подчеркивает актуальность и научно-практическую значимость работы.

Обзор литературы начинается с краткой истории развития масс-спектрометрии. В следующем разделе Вавилов Н.Э. уделяет внимание проблемам

регистрации пептидов при масс-спектрометрическом анализе, дает характеристику чувствительности различных анализаторов.

Завершает обзор литературы подробное описание методов фракционирования пептидов и белков, которые используются в современной протеомике.

Прочтение обзора литературы, опирающегося на самые свежие экспериментальные и теоретические работы, критическое отношение автора к результатам ученых, работающих в этой области, указывает на его высокую научную эрудицию и хорошее знание литературы по теме диссертации. Кроме того, литературный обзор написан довольно хорошим языком, четко структурирован.

Успешное решение поставленных Вавиловым Н.Э. задач во многом обусловлено применением широкого спектра современных методов биохимии, молекулярной биологии. Это позволяет высоко оценить научно-методический уровень выполненной работы и достоверность полученных автором результатов, свидетельствует о прекрасной методической подготовке автора.

В разделе «Материалы и методы» дается описание методов выделения белков, их ферментативного гидролиза, фракционирования белков, разделения пептидов, идентификации белкового состава с помощью тандемной масс-спектрометрии, а также метод таргетного протеомного анализа с использованием изотопно-меченых пептидов.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены основные полученные автором результаты. С использованием стандартного образца Вавилов Н.Э. показывает, что причинами низкого уровня идентификации белков протеома человека является недостаточная чувствительность и ограничения по динамическому диапазону измерений комплексных биологических образцов.

Вавиловым Н.Э. разработана методика, которая включает в себя дополнительную стадию фракционирования пептидов – обращенно-фазовую хроматографию в щелочных условиях. В качестве объекта была использована линия клеток НерG2. Показано, что разработанная методика 2D фракционирования белков этих клеток приводит к увеличению чувствительности по сравнению с 1D вариантом в 2,3 раза по количеству зарегистрированных белков. При этом с

помощью 1D Shotgun анализа обнаружено 18 белков, кодируемых генами 18 хромосомы человека, а при применении метода 2D -33.

На следующем этапе Вавиловым Н.Э. было убедительно показано, что применение методов таргетного протеомного анализа позволило суммарно обнаружить 94 белка, кодируемых генами 18 хромосомы человека. Применение метода двумерного фракционирования (2D SRM) увеличило число идентификаций на 26.

Интересной частью работы является анализ транскриптома клеток HepG2 с целью оценки сходимости протеомных и транскриптомных данных. Факт детекции белков, для которых отсутствует соответствующая мРНК, а также обратная ситуация, уже описывались в литературе ранее. В итоге, в работе показано, что использование всех методов протеомного анализа позволяет зарегистрировать 100 белков, что составляет 69% зарегистрированного транскриптома и 38% всех белок-кодирующих генов, локализованных на 18 хромосоме человека.

Комплексность работе придает раздел, посвященный применению разработанного метода 2D фракционирования для анализа клинических образцов, а именно, аутопсийных образцов печени человека. С использованием таргетных методов было зарегистрировано 129 белков, кодируемых генами 18 хромосомы человека, при этом 63 и 110 белков с использованием 1D SRM и 2D SRM методик, соответственно.

Таким образом, достоверность научных результатов не вызывает сомнений. Экспериментальная часть работы выполнена с использованием современной научной базы. Выводы диссертации согласуются с известными теоретическими и практическими знаниями.

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ (все в зарубежных журналах), 2 тезиса зарубежных конференций.

Подводя итог, следует отметить, что работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Полученные Вавиловым Н.Э. результаты не вызывают сомнений, выводы работы надежно подкреплены экспериментальными данными и являются обоснованными.

Тем не менее, к работе есть некоторые вопросы и замечания.

Стр. 8 . Формулировка «В дальнейшем разработанный метод был использован при анализе клинических образцов печени человека от **здоровых доноров** для оценки стабильности и воспроизводимости измерений» вызывает недоумение, поскольку в разделе «Материалы и методы» говорится, что это «посмертно удаленные образцы». Можно было обойтись термином «образцы печени» с последующим разъяснением источника происхождения. Кроме того, на странице 81 в заголовке подраздела (и несколько раз ниже по тексту) эти образцы называются «образцами нормальной печени человека».

Стр. 49. Непонятно происхождение, как формулирует автор, «стандартного объекта UPS1» (производитель, белковый состав). Вероятно, это UPS1 & UPS2 Proteomic Standards (Sigma – Aldrich).

Там же. Из раздела «Материалы и методы» неясно, какое количество клеточного материала (печень, клетки линии HepG2) берется для выделения белков приведенным методом. На странице 74 упоминается количество 3 миллиона клеток.

Стр. 60. Чем можно объяснить, что часть пептидов идентифицируется исключительно в не фракционированном образце?

Стр. 63. Указывается, что потери идентификаций при хроматографическом разделении пептидов в щелочных условиях происходят из-за несовершенства системы сбора фракций. По мнению авторов, это единственная причина?

Стр. 86. Большую информативность подразделу придало бы указание названий белков, а не только их номера в базе данных.

Вместе с тем, указанные недочёты никоим образом не умаляют значимости диссертационного исследования и не снижают общего высокого уровня работы.

Диссертация Вавилова Н.Э. является целостным и завершённым научным исследованием. По актуальности поставленных задач, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа, представленная соискателем Вавиловым Никитой Эдуардовичем, полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения научных степеней», утверждённого постановлением Правительства

5