

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный
исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи
(ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУН «ФИЦ

питания и биотехнологии»

академик РАН, д.м.н.,

профессор,

 Д.Б.Никитюк

«07» сентября 2023 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Вавилова Никиты Эдуардовича «Детекция
низкопредставленных белков 18 хромосомы методами таргетной протеомики»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.4 -биохимия

**Актуальность темы выполненной работы и её связь с планами соответствующих
отраслей науки**

Темой диссертационной работы Вавилова Н.Э. является разработка и оптимизация методов протеомного анализа применительно к белкам, кодируемым генами 18-й хромосомы человека, и с особым вниманием к детекции белков, представленных в клетке в ультрамалых количествах (низкопредставленные белки). Протеомика, как совокупность методов идентификации, качественного и количественного анализа белков биологических объектов в полной совокупности (протеома) давно и интенсивно используется в широком спектре биохимических и молекулярно-биологических исследований, как фундаментальных, так и имеющих клиническую направленность. Однако принципиальной проблемой протеомных исследований, не преодоленной полностью в настоящее время, является недостаточная чувствительность применяемых методов протеомного анализа. По существующим оценкам, в состав генома человека входит около 20000 кодирующих генов, а количество соответствующих им белков (продуктов трансляции), возможно, превосходит 1 миллион, с учетом продуктов альтернативного сплайсинга, множественных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), а также огромного числа вариантов молекул белка, образующихся в результате пост-трансляционной модификации. В настоящее время едва ли 10-20% всех этих белковых форм доступны для выявления и учета методами протеомики. Причиной этого

является как то, что множество белков протеома являются «низкопредставленными» (то есть транслируются в ограниченном числе копий, до 100 или менее на клетку), так и наличие методических трудностей, в частности, низкой степени ионизации характеристических (протеотипических) пептидов, вследствие чего стандартное масс-спектрометрическое оборудование «не видит» соответствующий этому пептиду белок. При этом, многие из «низкопредставленных» белков обладают высокой функциональной значимостью, относясь к числу ядерных транскрипционных факторов, молекул межклеточных взаимодействий и внутриклеточных сигнальных путей (протеинкиназы и др.). Это ограничивает практическую область использования протеомики, в том числе, при контроле биомаркеров патологического процесса в клинике. Таким образом, тема диссертации Вавилова Н.Э., направленная на повышение чувствительности протеомных исследований на примере функционально значимых белков 18-й хромосомы человека, безусловно, актуальна и обладает большой научно-теоретической и практической значимостью для фундаментальной и клинической биохимии.

Диссертационная работа Вавилова Н.Э. **выполнена в основном русле научных исследований**, проводимых в ФГБУН «НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича» по теме, связанной с расшифровкой структуры и установлением функции белков в рамках глобального международного проекта «Протеом человека» (Human Proteome Project, HPP) и его «хромосоמוцентрического» ответвления, при котором задачи изучения белков каждой из хромосом были распределены между странами - участницами. Российским сегментом данного многолетнего проекта, как известно, явился анализ белков 18-й хромосомы, которому и посвящено диссертационное исследование автора.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

В работе Вавилова Н.Э. впервые установлены факторы, лимитирующие детекцию низкокопийных белков в биологических образцах в культуре клеток и ткани печени человека. Впервые разработан и успешно применен высокочувствительный метод таргетного протеомного анализа (2D SRM), использующий двумерное хроматографическое фракционирование комплексных биологических образцов, что позволило значительно снизить влияние биологического матрикса на детекцию целевых белков 18-й хромосомы, включая низкокопийные формы. Детально охарактеризованы возможности данного метода, показаны его преимущества перед стандартными одномерными методами анализа на примере линии клеток HepG2, представляющих собой трансформированный аналог гепатоцитов человека. Доказано, что при этом возможна детекция белков, не представленных в клетке значимыми количествами своих РНК-транскриптов и не выявляемых из-за этого с помощью технологий высокопроизводительного транскриптомного анализа RNA-seq (Illumina). Представлены убедительные объяснения причин указанных расхождений результатов транскриптомного и протеомного анализа. С помощью разработанного автором нового высокочувствительного метода протеомного исследования впервые идентифицированы и количественно определены 129 белков, кодируемых генами 18

хромосомы, в клинических образцах печени человека, что явилось подтверждением возможности трансляции предлагаемых подходов в практику клинико-лабораторных исследований.

Теоретическая и практическая значимость полученных автором результатов

Полученные в работе Вавилова Н.Э. научные данные позволяют углубить имеющиеся представления о причинах недостаточной чувствительности существующих протеомных методов при детекции низкопредставленных белков в биологических образцах. Одной из этих причин является выбор в процедурах детекции протеотипических пептидов, обладающих низким уровнем ионизации и не регистрируемых при масс-спектральном анализе, особенно, если изучаемый белок представлен в клетке недостаточным числом копий. Автором предложены подходы, позволяющие обойти эту проблему за счет предсказания состава протеотипических пептидов, дающих в условиях протеомного анализа наибольшую чувствительность детекции. Разработанный Вавиловым Н.Э. подход позволяет с успехом детектировать и количественно оценивать уровень экспрессии белков, которые не могут быть выявлены в пределах чувствительности стандартного таргетного и панорамного МС анализа. Предложенный автором метод, включая использование при таргетном МС-анализе внутренних стандартов, представляющих собой пептиды, меченные стабильными изотопами ^{13}C и ^{15}N , позволяет достоверно обнаружить очень низкие концентрации белка, а именно, до 100 копий на клетку. Путем аннотирования аминокислотных последовательностей этих низкокопийных белков подтверждена их высокая биохимическая значимость, в частности, роль в таких важных процессах, как транскрипция генетической информации и внутриклеточная передача сигнала. Тем самым доказано, что детекция низкокопийных белков является высоко значимой в биохимических исследованиях. Белки, обнаруживаемые при помощи нового метода, позволяют получить более полную и осмысленную информацию об исследуемой биологической системе по сравнению со стандартными методиками МС анализа. Разработанный Вавиловым Н.Э. подход может быть с успехом перенесен в клиническую практику при оценке белков – биомаркеров патологического процесса, которые до настоящего времени были практически недоступными для количественного учета традиционными масс-спектрометрическими, а также иммунохимическими методами из-за их недостаточной чувствительности.

Разработанные в работе Вавилова Н.Э. методические подходы допускают масштабирование и трансляцию в практическое здравоохранение ввиду общемировой тенденции к повышению производительности методов протеомного анализа, тандемной панорамной и таргетной масс-спектрометрии, снижению их стоимости с последующим переводом этих технологий в разряд рутинных клинико-диагностических исследований. Результаты и выводы диссертации могут быть востребованы в научных учреждениях, выполняющих фундаментальные и клинические протеомные и метаболомные исследования, а также ведущих работы по развитию высокопроизводительных методов анализа биомаркеров для целей клинической диагностики. К таким организациям, помимо

собственно ФГБУН «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», относятся ФНКЦ физико-химической медицины, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Институт медико-биологических проблем РАН, Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт биохимической физики им. Н.М.Эммануэля РАН, НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина Минздрава России, ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, НИИ Физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ, Институт биофизики клетки РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, ФГБУ НМИЦ кардиологии им. Е.И.Чазова Минздрава России и другие научные и клинические учреждения.

Структура и основное содержание работы

Диссертационная работа Вавилова Н.Э. построена по традиционной схеме и состоит из следующих глав: введение, обзор литературных источников, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы, который включает 122 источника (все на иностранных языках), источник финансирования, благодарности. Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 36 рисунков.

Во «Введении» автор раскрывает актуальность выбранной темы исследования, степень разработанности темы, формулирует цели и задачи диссертационной работы, а также приводит ключевые характеристики работы, включающие научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов. Целью исследования является определение факторов, лимитирующих детекцию белков при протеомных методах анализа, и разработка методов для высокочувствительной масс-спектрометрической детекции низкокопийных белков, кодируемых генами 18 хромосомы человека. При этом были поставлены следующие задачи:

- определить факторы, лимитирующие детекцию белков, при использовании таргетного масс-спектрометрического анализа на примере стандартного объекта - упрощенной белковой системы UPS1;
- разработать методы преодоления факторов, лимитирующих детекцию белков, и апробировать их на биологическом объекте – клеточной линии HepG2;
- оценить эффективность метода и провести анализ протеомных и транскриптомных данных, полученных на клетках линии HepG2;
- применить высокочувствительный метод таргетного масс-спектрометрического анализа с использованием двумерного фракционирования пептидов для оценки стабильности количественного анализа и детекции низкокопийных белков, кодируемых генами 18 хромосомы человека, в клинических образцах печени от здоровых доноров.

«Обзор литературных источников» состоит из четырех подразделов. В первом автор приводит сведения по истории создания масс-спектрометрического метода анализа и

раскрывает современное состояние вопроса об использовании этого метода в исследовании наиболее сложных органических соединений, включая пептиды и белки. Второй подраздел посвящен ходу реализации проекта «Геном человека», перешедшего впоследствии, в процессе своего логического развития в проект «Протеом человека», осуществляемый в настоящее время на международной основе с использованием «хромосомоцентрического» подхода, при котором каждая страна - соисполнитель производит детальный анализ состава, структуры и аннотирование функции белков, кодируемых генами определенной хромосомы (в случае России это 18-я хромосома). В третьем подразделе раскрываются проблемы, возникающие при масс-спектрометрической регистрации белков, излагаются ограничения чувствительности существующей приборной базы. Наконец, четвертый раздел посвящен роли методов предварительного фракционирования белкового образца (главным образом, с применением электрофоретических и хроматографических методов) для снижения разнообразия представленных белков биологического матрикса, следствием чего является повышение чувствительности масс-спектральной детекции целевых пептидов и соответствующих им белков (компонентов протеома). В заключении раздела приведено обоснование применяемых в работе экспериментальных подходов, цели и задачи исследования. В целом, содержание обзора свидетельствует о высоком уровне компетенции автора в области протеомного анализа и масс-спектрометрии.

Раздел «Материалы и методы» описывает применяемые в работе клинические и экспериментальные образцы (ткань печени человека, стандартные образцы изотопно-меченных пептидов для регистрации белков, кодируемых генами 18 хромосомы), методы исследования, включая выделение белка и его ферментативный гидролиз трипсином, фракционирование методом ВЭЖХ, идентификация белкового состава образца с помощью тандемной масс спектрометрии (Shotgun) с использованием детектора высокой точности (Orbitrap), твердофазный синтез пептидов, таргетный протеомный анализ с использованием изотопно-меченых пептидов в качестве внутренних стандартов (SRM). На основании материалов данного раздела можно заключить, что экспериментальная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием самых современных аналитических и биоинформатических методов.

В разделе «Результаты и обсуждение» представлены основные результаты работы, сгруппированные в соответствии с поставленными задачами. Во-первых, это анализ ограничения методов протеомных технологий в классических вариантах панорамного и «Shotgun» исследования на примере модельной белковой системы, состоящей из референтной белковой смеси UPS1 и лизата белков кишечной палочки, используемого в роли матрикса. Далее автором представлены результаты по разработке и оценке эффективности методики «2D Shotgun» на модельном объекте клеточной линии HepG2. За этим следует аннотирование функции и клеточной локализации белков, идентифицированных при Shotgun 1D и Shotgun 2D протеомном исследовании с помощью Gene ontology (GO). Эти данные дополнены анализом принадлежности обнаруженных

белков к различным метаболическим путям по версии базы данных Reactome. Затем автором выполнен анализ 20 клеточных линий методом панорамной масс-спектрометрии для подбора пептидов с оптимальными параметрами эффективности ионизации для таргетного анализа, осуществлен синтез изотопно-меченных аналогов данных пептидов, используемых в качестве внутренних стандартов, проанализирована эффективность их ионизации при электроспрее и проведена разработка и оценка эффективности методики 2D SRM на модельном объекте гепатоцитов HepG2. После этого разработанный метод был применен автором для таргетного анализа (SRM SIS) белков, кодируемых генами 18-й хромосомы человека, в клетках указанной линии. Полученные данные были далее сопоставлены с результатами транскриптомного исследования этих же образцов и проанализированы причины возможных расхождений данных протеомного и транскриптомного анализа. В заключение экспериментальной части выполнена оценка стабильности и воспроизводимости метода двумерного фракционирования на примере клинических образцов нормальной печени человека. Анализ раздела «Результаты и обсуждение» свидетельствует, что все задачи исследования, поставленные автором в разделе «Введение», выполнены полностью.

В разделе «Заключение» подводятся итоги выявленных в ходе исследования экспериментальных фактов, в сравнительном аспекте анализируются преимущества и недостатки различных вариантов масс-спектрометрического анализа белков, раскрываются преимущества и перспективы применения предложенных автором новых методических подходов.

По результатам исследования Вавилова Н.Э. сформулированы 4 вывода и 3 положения, выносимые на защиту. Выводы диссертации четко и количественно сформулированы, логично вытекают из проделанной работы, соответствуют в целом поставленным во «Введении» задачам исследования и необходимым образом отражают полученные результаты. Положения, выносимые на защиту, в таком виде, как они представлены в автореферате диссертации, в достаточной степени характеризуют авторскую научную позицию по существу проделанных исследований.

Обоснованность результатов и выводов исследования

Результаты диссертации Вавилова Н.Э. получены на современном, высокоточном, высокочувствительном оборудовании, с использованием высокотехнологичных, высокочувствительных, высокопроизводительных, чувствительных и специфичных методов, аттестованных международных референтных и стандартных образцов. Методы, использованные при определении количественных индикаторов, метрологически валидированы. Аналитические тесты проведены с достаточным количеством технических повторов. Результаты обработаны с использованием адекватных современных методов математической статистики, включая кластерный анализ, метод главных компонент и другие. При заборе клинических образцов для исследования в полном объеме соблюдены принципы биомедицинской этики. Обсуждение полученных результатов, формулирование гипотез и рабочих концепций исследования поведены автором с привлечением данных

современной научной литературы, удовлетворяющих критериям научной непротиворечивости и полноты, включая новейшие работы по программе «Протеом человека» за 2021-2022 годы. Таким образом, достоверность и обоснованность выводов из исследования и сделанных рекомендаций не вызывает сомнения.

Оценка публикаций по теме исследования

По теме диссертации Вавилова Н.Э. опубликовано 6 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных наукометрических базах Web of Science, Scopus и PubMed, и 2 тезиса на международных научно-практических конференциях. Тематика всех включенных в список публикаций соответствует теме диссертационного исследования. Профиль журналов, в которых представлены публикации, соответствует специальности «биохимия».

Автореферат диссертационной работы Вавилова Н.Э. содержит все необходимые разделы, и в полной мере отражает суть проведенного автором исследования.

Личный вклад автора

Как следует из данных, представленных в диссертации и автореферате, личный вклад автора – Вавилова Н.Э. в выполнение диссертационной работы является не вызывающим сомнений, значительным и масштабным, и включает поиск и анализ литературы, планирование экспериментов, пробоподготовку к протеомному анализу, масс-спектрометрический анализ на системах ВЭЖХ/МС: Orbitrap, Triple Quad, и хроматографический анализ на системе ЖХ/УФ, а также биоинформатический анализ и интерпретацию полученных протеомных данных и подготовку статей к публикации.

Замечания к работе

Принципиальных замечаний по содержанию диссертационной работы Вавилова Н.Э., сути полученных результатов, новизне, научно-теоретической и практической значимости не имеется.

Вместе с тем, следует указать на ряд замечаний по оформлению работы.

В первую очередь, это относится к стилю изложения раздела «Положения, выносимые на защиту» в таком виде, как он представлен в тексте диссертации. Из трех положений, выносимых на защиту, только положение № 2 и вторая фраза в положении № 3 отвечают требованиям к содержанию данного раздела, то есть в сжатой форме отражают научную позицию автора по существу изучаемых вопросов. Вся остальная часть этого раздела, включая «положение № 1» целиком, представляет собой, по существу, повторный пересказ полученных автором результатов. Формулировки раздела «Положения, выносимые на защиту», представленные в автореферате и в диссертации, различаются.

Следует отметить, что при написании текста работы автором используются жаргонные технические термины, не подходящие для изложения результатов академического исследования. Так, многократно встречаются такие обороты, как «в кислом pH среды», «при кислых значениях pH», «в кислых условиях» (правильно было бы «в кислой среде» или «при низких значениях pH»), «в щелочных условиях разделения»,

«хроматография в щелочных условиях» (вместо «хроматография со щелочной подвижной фазой» или «хроматография с использованием щелочного элюента»). Кроме этого, обращает на себя внимание значительное количество ошибок в расстановке по тексту запятых, которые в большом числе необходимых случаев отсутствуют, либо, напротив, являются лишними (особенно заметно это в разделе «Обзор литературных источников»). В тексте рукописи замечены опечатки (с. 84, 90).

Глава «Материалы и методы исследования», хотя и дает развернутое представление о примененных автором методах масс-спектрометрии и хроматографического фракционирования, не содержит, на наш взгляд, некоторых важных разделов. Это относится к характеристике использованных при протеомном анализе стандартных и референтных образцов, а также примененной в качестве модельного объекта клеточной линии. По нашему мнению, использованная клеточная линия охарактеризована в работе недостаточно подробно, не приведены сведения, характеризующие фенотип клеток и подтверждающие их принадлежность к данной линии, а также не представлены данные, которые подтверждали бы жизнеспособность указанной перевиваемой клеточной линии в условиях эксперимента. Также глава «Материалы и методы» не содержит такого важного для работы в целом раздела, как описание использованных методов статистической и биоинформатической обработки данных. В частности, не указано, каким образом проводилось автором построение диаграмм Венна - делалось ли это «в ручном режиме» или же применялось какое-то сетевое приложение.

Приведенные замечания не относятся к сути проделанных Вавиловым Н.Э. исследований и не снижают высокую оценку работы в целом.

Вопрос к диссертанту

В автореферате в подписи к рис.5 указывается, что «*В абсолютном количестве в 2D Shotgun анализе было зарегистрировано в 2,3 раза больше белков, однако процентное соотношение зарегистрированных белков по группам остается равным*». Необходимо пояснить, что понимается под *процентным соотношением* зарегистрированных белков? Идет ли речь об их распределении по различным локализациям в клетке, по метаболическим путям или по количеству белков, выявленных разными методами? Из данных рисунка (числовые обозначения в секторах кругов) видно, что соотношение в %% между белками, относящимися к различным клеточным компартментам и метаболическим путям изменяется, хотя и не очень выражено (в пределах 1-3%). Следует ли это понимать таким образом, что эти изменения являются незначимыми?

Заключение

Таким образом, диссертация Вавилова Н.Э. на тему «Детекция низкопредставленных белков 18 хромосомы методами таргетной протеомики» является законченной научно-квалификационной работой, удовлетворяющей критерию внутреннего единства, содержащей решение актуальной научной проблемы разработки метода высокочувствительного протеомного анализа низкопредставленных белков 18-й хромосомы человека, что имеет

большое значение как для развития методической базы современной биохимии, включая постгеномные (протеомные) технологии, так и для решения практических задач поиска и внедрения высокочувствительных и информативных биомаркеров различных заболеваний человека.

По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Вавилова Н.Э. на тему «Детекция низкопредставленных белков 18 хромосомы методами таргетной протеомики» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, согласно п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), а автор работы – **Вавилов Никита Эдуардович**, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 - биохимия.

Доктор биологических наук 1.5.4
(03.01.04) - биохимия, главный
научный сотрудник лаборатории
пищевой токсикологии и оценки
безопасности нанотехнологий
ФГБУН «ФИЦ питания и
биотехнологии»



Гмошинский Иван Всеволодович

Кандидат медицинских наук 3.2.1
(14.02.02) – гигиена, старший
научный сотрудник лаборатории
пищевой токсикологии и оценки
безопасности нанотехнологий
ФГБУН «ФИЦ питания и
биотехнологии»



Шипелин Владимир Александрович

Подпись руки Гмошинского И.В.
ЗАВЕРЯЮ: ученый Мартинев Н.Ю.
секретарь "07" сентября 2023 г.



Отзыв ведущей организации обсужден и принят на межлабораторной научной конференции ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Протокол № 2 от «07» сентября 2023 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»). Адрес: 109240, г. Москва, Устьинский проезд д.2/14. Тел. +7 (495) 698-53-60; +7 (495) 698-53-71; Факс +7 (495) 698-53-79; e-mail mailbox@ion.ru; сайт <http://ion.ru/>