

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Куликовой Вероники Алексеевны

«Механизмы образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов рибозидов никотинамида и никотиновой кислоты в клетках человека»

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук (специальность 03.01.03 – Молекулярная биология)

Актуальность и новизна работы.

В последнее время появилось много данных о том, что широко известный субстрат окислительно-восстановительных реакций, никотинамидадениндинуклеотид (NAD), принимает участие и во многих регуляторных процессах животных клеток. Такие процессы тесно связаны с рядом ранее не известных производных данного динуклеотида, и требуют нового уровня понимания метаболизма NAD. Поэтому актуальность проведенного В.А.Куликовой исследования путей превращения ключевых интермедиатов такого метаболизма и участвующих в этих превращениях ферментов не вызывает сомнений. Очевидна и новизна полученных в работе результатов. Так, в качестве новых участников метаболизма NAD идентифицированы на молекулярном уровне изоферменты 5'-нуклеотидаз и семейства переносчиков нуклеозидов. Кроме того, проведенное исследование установило новые молекулярные механизмы межклеточного взаимодействия путем обмена ключевых интермедиатов NAD.

Научно-практическая значимость работы

Диссертационная работа В.А. Куликовой носит фундаментальный характер. Полученные в ней новые знания о метаболизме одного из важнейших для биосистем динуклеотидов, несомненно, являются научным достижением, и имеют большое практическое значение как сами по себе, так и в связи с биоинженерной направленностью работы. В частности, были созданы и апробированы клетки человека с модифицированными свойствами, причем небольшая доля таких трансформированных клеток была способна поддерживать жизнеспособность в

клетках с необратимыми нарушениями метаболизма. Этот результат работы открывает перспективы для решения ряда проблем медицины и биоинженерии.

Общая характеристика работы

Диссертация В.А. Куликовой изложена на 91 странице, построена по классическому плану и включает следующие главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы», содержащий 189 наименований, и «Благодарности». Материалы диссертации иллюстрированы 25 рисунками и 8 таблицами. В качестве общего комментария хочется отметить понятный и правильный язык автора, четкое построение фраз и логику изложения. Эти достоинства позволяют читателю легко разобраться с непростым метаболизмом, исследованным в работе.

Введение включает требуемые разделы «Актуальность работы», «Цели и задачи исследования», «Научная новизна и практическая значимость», «Личный вклад соискателя», «Положения, выносимые на защиту», «Степень достоверности и апробация результатов», позволяющие читателю получить представление о теме, сути и подходах диссертационного исследования.

Обзор литературы хорошо структурирован, содержит необходимые для понимания сложного метаболизма NAD иллюстрации и таблицы, достаточно полно отражает современное состояние науки в этой области. Автор приводит имеющиеся на сегодняшний день в литературе данные о роли различных форм, предшественников или производных динуклеотида как в метаболизме клетки, так и в ее регуляции. Описание регуляторных NAD-зависимых модификаций белков, таких как деацетилирование и АДФ-рибозилирование, хоть и не имеет прямого отношения к работе, но позволяет в полной мере оценить ее научную значимость. Более существенной для понимания постановки цели и задач исследования являются заключительные главы обзора о механизмах биосинтеза NAD из его ключевых предшественников и их импорта в клетку, а также связи метаболизма NAD и нуклеотидов. В данной главе автор также приводит очень интересные примеры влияния никотинамидрибозида (NR) на регенерацию тканей и для терапии нейропатологий и диабета у грызунов.

В связи с обзором хотелось бы уточнить представления автора о механизме регуляции сиртуинов отдельными соединениями пула NAD. Фраза на стр. 25 «данные ферменты используют NAD в качестве ко-субстрата, их активность зависит от биоэнергетического статуса клетки, который, помимо всего прочего, определяется концентрацией NAD, а также соотношением $NAD^+/NADH$ » предполагает, что такой механизм определяется не только доступностью NAD, но и соотношением его окисленной и восстановленной форм. Однако не приведены конкретные источники, в которых была бы исследована зависимость активности сиртуинов от указанного соотношения *in vitro*. Было бы полезно указать такие источники, если они имеются. В противном случае требуется более аккуратная формулировка вышеуказанной фразы.

Глава «Биосинтез NAD» начинается фразой: «В результате всех описанных выше NAD-зависимых сигнальных реакций динуклеотид расщепляется на Nam и ADP-рибозу (Рис. 1.1Б), поэтому для их эффективного осуществления клетке необходимо постоянно поддерживать определенный уровень динуклеотида». Данная фраза предполагает, что, независимо от специфики клеток, сигнальные реакции постоянно требуют значительного расхода пула NAD, сравнимого с участием данного пула в метаболизме. Однако так ли это? Работы по превращению NAD для обеспечения поли-АДФ-рибозилирования указывают на то, что такие процессы ведут к уменьшению пула NAD лишь в патологических состояниях. С другой стороны, участие производных NAD в мобилизации кальция вряд ли связано с образованием данных сигнальных метаболитов в количестве, сравнимом с субстратными количествами NAD, участвующего метаболизме. Наконец, ввиду множественных путей биосинтеза NAD было бы интересно узнать, известно ли что-либо о специфичности определенных путей в том или ином типе клеток.

В разделе «Материалы и методы» представлен широкий спектр современных методов молекулярной и клеточной биологии, позволивших автору эффективно решить поставленные задачи. Тем не менее, описание использованных подходов, особенно молекулярно-биологических, является достаточно кратким, что обычно характерно для статей с дополнительными материалами, которые в диссертации не приняты именно в связи с более подробным описанием в методическом разделе. Отсутствует определение понятия «временная трансфекция». Кроме того, при описании культивирования клеток не указывается, был ли контроль монослоя и

какова была степень его смыкания (конфлуентность). Поскольку использовались клеточные линии, которые достаточно быстро растут, данный вопрос является особенно существенным для исследований выживаемости, где клетки находились в среде в течение 7 дней. Разная скорость роста таких клеток в нормальном состоянии и при ингибировании метаболизма представляет существенную методическую трудность для сравнительных экспериментов при необходимости длительного наблюдения.

Небольшой вопрос по измерению активностей выделенных рекомбинантных белков: если активность определяли с разными нуклеотидами путем измерения высвобождающегося в ходе 5'-нуклеотидазной реакции неорганического фосфата, то не могли ли присутствующие в среде- очевидно, в качестве аллостерических активаторов, - АДФ или АТФ конкурировать с исследованными субстратами реакции по активному центру?

Раздел «Результаты и обсуждение» содержит подробное описание выполненных экспериментов и их анализ. Разработан и оптимизирован удобный метод анализа исследуемых метаболитов в культуральной среде. С помощью данного метода получены ключевые результаты диссертационной работы В.А. Куликовой, рассмотренные ниже. С использованием клеток HeLa авторам удалось показать, что нуклеозиды NR и NAR могут синтезироваться внутри клеток и выделяться этими клетками в среду. Хотя синтез и экскреция таких метаболитов другими клетками человека аналогичным способом не детектировалась, применение биоинженерных подходов позволило показать, что данный путь метаболизма может быть активирован и в этих клетках при трансфекции их определенными ферментами. Так, трансфекция рибозилтрансферазой никотиновой кислоты, но не никотинамида, усиливала экскрецию клетками целевого метаболита NAR при инкубации клеток в содержащей предшественники среде, причем это сопровождалось 3,5-кратным ростом содержания в клетках NAD. Далее, было показано, что, по сравнению с одиночной экспрессией NAPRT, количество нуклеозида NAR в кондиционированной среде значительно увеличивалось после ко-экспрессии с NAPRT с 5'-нуклеотидазами, причем продукция NAR возрастала при ко-экспрессии с CN-III > CN-II > CN-I. Таким образом, в работе установлено, что максимальная экскреция целевого метаболита наблюдается при ко-трансфекции NAPRT и CN-III. В результате небольшая доля трансфицированных

клеток, способных синтезировать и выделять в среду NAR, могла поддерживать жизнеспособность культуры клеток с необратимо нарушенным метаболизмом NAD. Этот результат является принципиальным с научной и медицинской точек зрения, поскольку показывает, что способность клеток использовать такой ключевой интермедиат синтеза NAD как NAR может определять регенерацию, усиление которой другим интермедиатом синтеза NAD (NR) было показано в экспериментах на животных. Доступность трансфицированных клеток, выделяющих такие метаболиты в среду, позволяет изучить их применение для усиления регенерации. В частности, при травматических поражениях мозга такие клетки могут быть более эффективными, чем используемые в настоящее время с целью усиления регенерации стволовые клетки.

Проведенные в работе кинетические исследования субстратной специфичности очищенных рекомбинантных 5'-нуклеотидаз предоставляют интересную информацию для анализа субстратной специфичности данных ферментов. В частности, можно отметить, что по кинетическому параметру V_{max}/K_m субстратная специфичность CN-III к NAMN ниже таковой для CN-II, тогда как экскреция трансфицированными клетками NAR была выше при ко-трансфекции CN-III по сравнению с CN-II. Данный результат может свидетельствовать о роли *in vivo* регуляции нуклеотидаз на уровне супрамолекулярных структур и/или клеточной компартментализации, предоставляя материал для дальнейших исследований.

Наконец, с использованием фармакологического подхода идентифицированы нуклеозидные переносчики семейств ENT и CNT, импортирующие нуклеозиды NR и NAR в клетки человека. В результате, работа значительно углубила наше понимание метаболизма NAD и его ключевых интермедиатов в животных клетках, сконструировав на этой основе клетки, синтезирующие целевые метаболиты.

По данной части работы можно сделать несколько замечаний технического характера. Так, не очень понятен смысл использования для нормализации экспрессии целевых белков окраски белка по Кумаси на рис. 4.10Б и почему такая окраска дана лишь для определенной области не указанной молекулярной массы. Поскольку активность выделенных рекомбинантных белков определяли путем измерения высвобождающегося в ходе 5'-нуклеотидазной реакции неорганического фосфата в присутствии АДФ и АТФ в качестве аллостерических

эффекторов, возникает вопрос о том, насколько специфичны 5'-нуклеотидазы к моно-, ди- и трифосфатам, т.е. могли ли добавляемые в среду как активаторы АДФ и АТФ выступать в качестве субстратов и/или конкурентных ингибиторов превращения исследуемых нуклеотидов. Субстратная специфичность лучше оценивается по параметру k_{cat}/K_m

Можно также высказать замечание о необходимости более подробного обсуждения полученных результатов и их анализа в свете опубликованных данных. Например, в связи с тем, что оптимизация метода анализа исследуемых метаболитов в культуральной среде проводилась, в частности, для достижения максимальной чувствительности метода (с. 43), следовало бы указать, какова эта чувствительность, в т.ч. относительно альтернативных методов измерения, и имеются ли таковые. Было бы интересно сравнить не только сходство, но и различия использованных в работе типов клеток в связи с исследованным метаболизмом NAD.

Автореферат полностью отражает основное содержание и выводы работы и, как и сама работа, обладает четкостью и внутренней логикой изложения. Некоторая неточность допущена при сокращении рис. 8, в подписи к которому говорится о данных для стволовых клеток, тогда как представлены лишь клетки НЕК.

Высказанные замечания ни в коей мере не снижают высокий научный уровень диссертационной работы.

Заключение

Считаю, что диссертационная работа В.А. Куликовой «Механизмы образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов рибозидов никотинамида и никотиновой кислоты в клетках человека», выполненная под руководством к.б.н. Андрея Анатольевича Никифорова, является законченной квалификационной работой и содержит новые данные о механизмах образования и возможности экспорта нуклеозидов NR и NAR, участвующих в их превращениях ферментах и механизмах импорта в клетку.

Считаю, что диссертационная работа Куликовой Вероники Алексеевны соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским

