

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)

Никотинамидадениндинуклеотид - NAD - давно известен своей ролью в окислительно-восстановительных реакциях, таких как гликолиз, цикл Кребса, окисление жирных кислот и окислительное фосфорилирование. В результате данных метаболических процессов окисленная форма NAD (NAD^+) обратимо переходит в восстановленную форму NADH. При этом расхода динуклеотида не происходит. Однако за последние 20 лет понимание биологической роли NAD значительно изменилось. Описана необходимость NAD для таких посттрансляционных модификаций белков, как деацетилирование и АДФ-рибозилирование. Данные регуляторные модификации приводят к изменению активности белков-мишеней, их способности взаимодействовать с другими белками или ДНК, и тем самым участвуют в регуляции важнейших клеточных процессов. В результате данных NAD-зависимых процессов динуклеотид расщепляется на Nam и АДФ-рибозу. Нарушения регуляции уровня динуклеотида приводят к развитию различных заболеваний. NAD абсолютно необходим для жизнедеятельности всех клеток, поэтому модуляция его биосинтеза является мощным инструментом для терапии различных патологий. Введение грызунам рибозида никотинамида (одного из основных предшественников NAD), эффективно повышает уровень внутриклеточного динуклеотида, тем самым, предотвращая развитие различных патологий или улучшая клинические проявления при наличии патологии. В связи с этим, изучение механизмов биосинтеза NAD и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов его предшественников, таких как рибозиды никотинамида и никотиновой кислоты, является **актуальной задачей** современной биологии и медицины.

Диссертационная работа В.А. Куликовой носит фундаментальный характер, однако, полученные результаты, также **имеют практическое значение** и могут быть в дальнейшем использованы для разработки новых терапевтических подходов к лечению различных нейродегенеративных, заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений метаболизма.

Диссертация В.А. Куликовой изложена на 91 странице, и состоит из 6 глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы», содержащий 189 наименований. Материалы диссертации иллюстрированы 25 рисунками и 8 таблицами.

Глава 1 включает традиционные главы, такие как «Актуальность работы», «Цели и задачи исследования», «Научная новизна и практическая значимость», «Личный вклад соискателя», «Положения выносимые на защиту», «Степень достоверности и апробация результатов» и вводит читателя в тему и суть диссертационного исследования.

Глава 2 написана правильным научным языком и достаточно полно отражает современное состояние науки в области изучения метаболизма NAD. Автор приводит имеющиеся на сегодняшний день в литературе данные о структуре и функциях динуклеотида в окислительно-восстановительном и энергетическом метаболизме клетки. Далее автор подробно описывает механизмы и роли в клетке таких регуляторных NAD-зависимых модификаций белков, как деацетилирование и АДФ-рибозилирование. В данный раздел также включена глава о механизмах биосинтеза NAD в клетках человека из различных предшественников. Помимо описания путей синтеза динуклеотида из ключевых предшественников в данной главе автор также приводит примеры использования нуклеозида NR для терапии заболеваний у грызунов. Обзор литературы заканчивается главой, описывающей метаболизм нуклеотидов. Именно эта глава подводит читателя к актуальности поставленной в работе цели. В данной главе автор делает упор на состояние исследований в области изучения механизмов образования нуклеозидов и их импорта в клетку.

В **главе 3** приводится детальное описание использованных экспериментальных подходов, таких как: культивирование клеток человека и их

трансфекция сконструированными автором векторами, измерение уровня NAD в клетке, а также детекция нуклеозидов NR и NAR в кондиционированной питательной среде с помощью ЯМР, экспрессия и очистка гибридных 5'-нуклеотидаз из бактериальных клеток с последующим детальным анализом их активности с различными субстратами, а также такие стандартные методы, как иммуноблоттинг и иммуноцитохимия. Таким образом, в диссертационной работе использовался широкий спектр современных методов молекулярной и клеточной биологии, позволивших автору эффективно решить поставленные задачи.

Глава 4 содержит подробное описание выполненных экспериментов и их анализ. Ключевыми результатами диссертационной работы В.А. Куликовой представляются следующие:

- оптимизирован метод детекции и количественного анализа метаболитов NAD в питательной среде методом ЯМР-спектроскопии;
- на культурах клеток показано, что клетки могут синтезировать и секретировать нуклеозид NAR в питательную среду;
- впервые описан механизм образования нуклеозидов NR и NAR в клетках человека путем дефосфорилирования моонуклеотидов NMN и NAMN 5'-нуклеотидазами CN-II и CN-III;
- на культурах клеток впервые продемонстрирована принципиальная возможность того, что одни клетки человека могут поддерживать эффективный синтез NAD в других клетках путем обмена предшественниками NAD;
- показано, что импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи белков семейств ENT и CNT.

В **главе 5** автор приводит убедительные выводы, сделанные на основе полученных результатов.

Диссертация написана логично и строгим научным языком, однако, встречается небольшое количество опечаток.

В целом по тексту диссертации хочется сделать ряд замечаний и задать несколько вопросов:

1. В разделах «Введение» и «Обзор литературы» имеет место путаница с NAD и NAD^+ . Не ясно, где под NAD подразумевается только NAD^+ , а где обе формы динуклеотида. Например, на рисунке 1.1 NAD^+ , а в тексте и в подписи к нему NAD. В ходе изложения следует четко определять конкретных участников процессов в тех случаях, когда не имеется ввиду общий пул.
2. В разделе «Материалы и методы» недостаточно подробное описание создания экспрессионных векторов. Например, не указаны последовательности праймеров, которые были использованы для амплификации последовательностей. Тоже касается метода Иммуноцитохимии. Описание настолько краткое, что воспроизвести эксперимент не представляется возможным.
3. В разделе «Результаты и обсуждения» достоверность различий указана лишь на рисунке 4.12 (стр. 61). Необходимо считать и указывать достоверность и в следующих экспериментах: Рис. 4.2B, 4.7, 4.10, 4.15, 4.16A, 4.17, 4.18, 4.19A.
4. Автором было показано, что клетки HeLa синтезируют и выделяют нуклеозид NAR (и, вероятно, NR) в питательную среду. В то время как после культивирования клеток НЕК 293 нуклеозиды в среде не детектировались. В связи с этим возникает небольшой вопрос: каков уровень экспрессии ферментов биосинтеза NAD в данных типах клеток? Чем обусловлены такие различия в способности синтезировать и секретировать нуклеозиды? Что известно о концентрации NAD в различных тканях и типах клеток, например, в мозге, в клетках крови?

Высказанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы и на её высокий научный уровень.

Автореферат полностью отражает основное содержание и выводы работы.

Работы автора, на основе которых написана диссертация, оформлены в виде 3 статей в рецензируемых научных журналах и 15 тезисов докладов. Результаты работы докладывались и обсуждались на 15 международных и отечественных конференциях. Опубликованные работы отражают основные результаты, являющиеся предметом защиты.

Считаю, что по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, объему проведенных исследований диссертационная работа Куликовой Вероники Алексеевны «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 оригинальной, законченной квалификационной работой и полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, а её автор, Куликова Вероника Алексеевна, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук»,

доктор биологических наук по специальности

03.03.01 - Физиология

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

06.12.2017



С.П. Гамбарян

Адрес: 194223, Российская Федерация, Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, д. 44, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук»

Телефон: (812) 552-79-01

Email: office@iephb.ru

Сайт: www.iephb.ru

Подпись д.б.н. С.П. Гамбарян заверяю
Ученый секретарь

