

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию **Богдановой Юлии Антоновны** на тему: «Исследование редокс-зависимых процессов с помощью хемогенетических инструментов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность и практическая значимость выбранной темы. Активные формы кислорода (АФК) вырабатываются во всех основных компартментах клетки. Они играют роль в регуляции разнообразных биологических процессах как вследствие селективной активации или подавления сигнальных каскадов, так и из-за повреждения природных низкомолекулярных соединений и макромолекул: ДНК, белков, липидов. Поэтому неудивительно, что развитие практически любых патологий ассоциировано с нарушением процессов выработки АФК и их нейтрализации. С середины 80х годов в этой области биологии существовал термин «окислительный стресс», подразумевающий нарушение грубого баланса между генерацией АФК и способностью клетки их нейтрализовать. Однако впоследствии стало понятно, что описание простого баланса не имеет значения, так как многие процессы опосредованы локальным действием отдельных типов АФК (прежде всего, пероксида водорода). Более того, в самой клетке были описаны ферменты, способные эффективно нейтрализовать АФК в сайте их образования, предотвращая диффузию по всей клетке. Однако изучение локального действия пероксида водорода и других видов АФК сильно ограничено из-за отсутствия удобных подходов к их направленному генерированию в отдельных компартментах. И данная диссертационная работа представляет один из таких подходов и показывает его применимость для решения целого спектра задач.

Юлия Антоновна Богданова использует оксидазу D-аминокислот дрожжей (DAAO) – фермент, субстратами которого являются отсутствующие в большинстве клеток млекопитающих D-изомеры аминокислот. Экспрессия гена этого фермента возможна в отдельных компартментах клетки, что дает возможность генерировать пероксид водорода в заданном месте клетки. И диссертант успешно показывает применимость метода, комбинируя направленную экспрессию гена DAAO с ранее разработанной системой ратиометрических сенсоров пероксида H_2O_2 . Действительно, использование непротеиногенной аминокислоты D-норвалина позволило генерировать пероксид водорода селективно в ядре митохондриях или цитоплазме и визуализировать субмикромольные и наномольные концентрации H_2O_2 . Диссертант установил существование градиента перекиси в клетках, что показывает эффективность клеточных систем нейтрализации этого

вида АФК. Более того, проведенный ингибиторный анализ указал на основной вклад тиоредоксиновой системы в такую нейтрализацию перекиси. Наконец, Юлия Богданова установила, что генерация пероксида водорода в кардиомиоцитах *in vivo*, сопровождающаяся нарушением экспрессии генов защиты клетки от окислительного стресса, действительно приводит к развитию сердечной недостаточности – систолической дисфункции и дилатационной кардиомиопатии. Наконец, в работе выявлена повышенная продукция пероксида водорода в DAAO-экспрессирующих нейронах гиппокампа, что говорит о существовании D-аминокислот в этом виде клеток. Таким образом, данная диссертационная работа дает очень удобный инструмент для исследований в области редокс-биологии: от изучения локального действия АФК до установления их роли в развитии различных патологий.

Диссертационная работы выполнена на очень высоком уровне с использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии и биохимии. Ю.А. Богданова создала конструкции для экспрессии DAAO в различных компартментах клетки или селективно в кардиомиоцитах, а также несколько мутантных вариантов с измененной субстратной специфичностью, получила транзиторно экспрессирующие их линии клеток, охарактеризовала продукцию пероксида при помощи ратиометрических сенсоров NuPer методом конфокальной микроскопии, оценивала вклад различных антиоксидантных систем в защите клетки от стресса при помощи низкомолекулярных ингибиторов, а также оценивала экспрессию генов антиоксидантной защиты методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Все эти методы позволили сделать и обосновать представленные в диссертационной работе выводы.

Структура диссертации. Диссертация построена по классическому плану и содержит следующие разделы: Введение, в котором сформулированы цели и задачи исследования, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение и список литературы. Работа изложена на 151 страницах, включает 19 рисунков и 1 таблицу, список цитируемой литературы состоит из 346 наименований. Материал диссертации изложен очень подробно, логично и связно, все выводы подтверждены результатами экспериментов, приведенными на рисунках.

Раздел "Обзор литературы" состоит из трех подразделов. Первый из них представляет основные данные о различных видах АФК, системах их генерирования и нейтрализации. Второй описывает основные подходы к направленному усилению продукции активных форм кислорода: CALI, флуоресцентным белкам KillerRed и др., белку miniSOG и собственно самой D-оксидазе аминокислот. Наконец, третий раздел описывает методы детекции пероксида водорода и обсуждает их достоинства и недостатки. Все эти

три раздела необходимы и достаточны для понимания работы. Некоторым недостатком этой части работы является отсутствие ссылок в части 1.1 и 1.1.2 (страницы 15-18), в которой вводятся основные понятия об АФК. Очень интересно было бы увидеть ссылки на оценку вклада различных источников АФК (и подтверждения данных об основном вкладе SOD в продукцию перекиси), а также увидеть данные о физиологических концентрациях пероксида. Однако следует подчеркнуть, что для диссертанта такие данные являются общеизвестными, из-за чего эти статьи не попали в список литературы (более 300 ссылок), и данное замечание не ставит под сомнение суть работы. Кроме того, в разделе 1.1.2.3 (Другие эндогенные источники пероксида) к сожалению, не упомянуты внепероксисомные катаболические ферменты, система фолдинга белков в эндоплазматическом ретикулуме и система цитохромов (особенно важная в клетках печени). Но опять же, эти системы не являются объектами исследования данным диссертационной работы. Наконец, в подразделе 1.1.3.3 (пероксиредоксины) можно было бы обсудить не только их кинетические характеристики, но и константы Михаэлиса (отражающие диапазон концентраций пероксида, в которых ферменты этого семейства могут нейтрализовывать этот вид АФК).

В главе «Материалы и методы» подробно описаны все использованные методики, перечислены использованные реактивы и оборудование, подробно описаны схемы конструирования плазмид. Все описанные методики достаточны для воспроизведения всех представленных экспериментов. Замечаний к этому разделу нет.

В разделе «Результаты и обсуждение» показана возможность генерирования пероксида водорода при помощи гиперэкспрессии DAAO в цитоплазме и обработкой клеток D-изомерами различных аминокислот с контролем специфичности сигнала сенсоров НуPer при использовании рН-сенсоров SynPer. Особо следует отметить продуманность диссертантом выбора аминокислот и возможной функции продуктов их катаболизма оксидазой. В результате выбор был сделан в пользу D-норвалина – непротеиногенной аминокислоты, которая обеспечивала продукцию перекиси гиперэкспрессированной DAAO без неспецифического изменения рН в клетке и влияния на ее жизнеспособность. Второй выбранной аминокислотой стал D-аланин, продуктом которого является природный пируват. Эти данные были подтверждены при гиперэкспрессии DAAO в матриксе митохондрий или ядре. Далее установлено, что усиление продукции перекиси в ядре приводит к созданию градиента этого вида АФК, что говорит о эффективности системы нейтрализации пероксида. Отдельно хотелось бы подчеркнуть замечательно придуманный и исполненный подход к анализу локализации пероксида водорода, заключающийся в экспрессии сенсора НуPer, слитого с кератином. Далее при помощи ингибитора тиоредоксинредуктаз ауранофина подтверждена роль этой системы защиты в

нейтрализации перекиси в ответ на окисление D-аминокислот. К сожалению, это направление не получило дальнейшего развития, которое могло заключаться в анализе вклада различных пероксиредоксинов в нейтрализации перекиси в разных компартментах клетки. Но это и не было задачей диссертационной работы. И далее в работе было показано, что предложенная система генерирования пероксида водорода позволяет вызвать как кратковременный, так и долговременный окислительный стресс.

Следующей частью работы слала оценка возможности продукции перекиси в нейральных клетках при помощи гиперэкспрессии DAAO. Однако автор отметил окисление сенсора НуPerf даже в отсутствие экзогенных D-аминокислот, что объясняется присутствием этих изомеров в таких клетках. Наконец, в заключительной части работы продемонстрировано, что усиление продукции пероксида водорода в кардиомиоцитах в отсутствие признаков фиброза действительно приводит к сердечной недостаточности у лабораторных животных.

Диссертационная работа Богдановой Ю.А. выполнена на очень высоком научном и техническом уровне, логична и тщательно описана. Достоверность всех представленных результатов основана на использовании многочисленных контролей и полностью подтверждена представленными экспериментальными данными. Выводы работы полностью соответствуют результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации.

По сути работы замечаний нет. Они касаются лишь оформления: работа изобилует ненужными англицизмами, которые, однако, не мешают ее восприятию. Есть и несколько вопросов. Так, при обсуждении существования градиента концентрацией пероксида при генерировании их в ядре и измерении в цитоплазме хотелось бы понимать оценку возможного вклада разбавления перекиси. Кроме того, на странице 83 можно было бы обсудить, какие концентрации пероксида являются физиологичными в разных компартментах клетки. Еще один вопрос: не проводил ли диссертант сравнение уровней перекиси в динамике в течение продолжительного времени. Он мог бы дать оценку изменений статуса антиоксидантных систем клетки. Наконец, не пробовали ли в работе или за ее рамками использовать подход по гиперэкспрессии DAAO в нейральных клетках для измерения концентраций D-аминокислот в клетках и тканях.

Вместе с тем очевидно, что перечисленные выше замечания и вопросы не влияют на суть и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным пп.9-14 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата

биологических наук (с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017 г. №650; 20.03.2021 г. №426), а ее автор Богданова Юлия Антоновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник,
заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

ИВАНОВ Александр Владимирович

11.02.2022

Подпись к.х.н. Иванова А.В. заверяю
Ученый секретарь Института
К.в.н. Бочаров Александр Анатольевич



Контактные данные:

119991, г. Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д.32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Тел.: +7 (925) 068-36-30 e-mail: aivanov@yandex..ru