

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук Медведевой Марии Витальевны

на тему «S-нитрозилирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы»,

по специальности 1.1.10. – «Биомеханика и биоинженерия»

Актуальность темы представленной работы обусловлена активно исследуемой в настоящее время проблемой оценки роли редокс-зависимой регуляции в процессах адаптации жизнеспособности клетки в стрессовых условиях. Адаптация к окислительному/нитрозативному стрессу происходит в краткосрочной перспективе за счет метаболического перепрограммирования и в долгосрочной перспективе – за счет генетического репрограммирования. Существенную роль в системе адаптационного механизма играют реакции посттрансляционной модификации, приводящие к редокс-зависимому изменению функциональной активности белков. Обратимый характер таких реакций обеспечивает редокс-переключения в активности сигнальных белков. Среди редокс модификаций наиболее часто имеют место реакции S-глутатионилирования и S-нитрозилирования, осуществляемые через SH-группу остатков Cys. В этой связи тему диссертационной работы Медведевой М.В., посвященную изучению S-нитрозилирования одного из ключевых ферментов гликолиза - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), несомненно, следует рассматривать как актуальную и важную для развития как фундаментальных представлений о редокс-зависимой регуляции, так и практических подходов в использовании её механизмов.

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 204 источника. Работа изложена на 187 страницах,

иллюстрирована 55 рисунками и 7 таблицами. Все главы взаимосвязаны и логически последовательны.

Во введении автор убедительно обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цели и задачи, которые отражают логику исследования и полностью реализованы в содержании работы. Введение содержит описание степени разработанности темы, научной новизны, теоретической и практической значимости, методологии исследования, степени достоверности данных, охарактеризован личный вклад автора, перечислены положения, выносимые на защиту, и публикации по теме диссертации.

В обзоре литературы представлен детальный анализ структуры ГАФД и его функции как одного из ключевых ферментов гликолиза, освещены и его неканонические функции: регуляция апоптоза и контроль экспрессии генов, роль в транспорте железа. В частности, автор говорит о ацилфосфатазной активности фермента, которая может влиять на гликолиз, ускоряя его в ущерб синтезу АТФ в экстремальных случаях, когда содержание восстановленного глутатиона в клетке значительно снижается. Подробно рассматриваются посттрансляционные модификации ГАФД, среди которых выделяются модификации по каталитическому остатку Cys152 (S-сульфенирование, S-нитрозилирование и S-глутатионилирование), что приводит к подавлению способности фермента катализировать гликолитическую реакцию окислительного фосфорилирования и проявлению его неканонических функций. Автор акцентирует внимание на S-нитрозилировании ГАФД, показывая отсутствие до настоящего времени прямого доказательства существования стабильной S-нитрозилированной формы ГАФД. Определенное внимание уделено роли модификаций ГАФД в активации апоптоза, показывая, что такой способностью обладают окисленные формы и амилоидоподобные агрегаты ГАФД. Подробно рассматривается схема NO-индуцированного апоптоза, опосредованного ГАФД через его S-нитрозилирование. Обсуждается возможная роль ГАФД в транснаитрозилировании как актина, так и других белков, подчеркивая,

необходимость экспериментального подтверждения. Обзор свидетельствует о прекрасной ориентации автора в научной литературе по данному направлению и его способности критически анализировать данные. Однако впечатление от обзора было бы лучше, если бы автор в конце дал бы заключение по проведенному литературному анализу, что послужило бы определенным обоснованием проведенной им экспериментальной части работы.

В главе «Материалы и методы исследования» детально описаны методы, которые адекватны поставленным задачам и цели диссертационного исследования. Автором применен широкий и разносторонний набор современных методических приемов, что говорит о его высокой методической подготовленности. Для реализации цели работы использованы биохимические методы, методы работы с культурами клеток, спектроскопия кругового дихроизма, проточная цитометрия, ESI и MALDI-TOF-масс-спектрометрия. Все использованные методики применены в соответствии с общепринятыми стандартами и с надлежащими контролями.

В главе «Результаты и обсуждение» автором представлена полная информация о проведенных исследованиях, доказывая достижение цели диссертационной работы логически последовательным выполнением поставленных задач, что подкреплено достаточным фактическим материалом в виде таблиц и рисунков. Результаты подробно описаны и обработаны с помощью адекватных методов статистического анализа. Глава подразделена на 7 подразделов.

Первый подраздел посвящен получению препаратов ГАФД из мышц кролика белков и рекомбинантной ГАФД человека из клеток *E. Coli*, оценка структуры которой была проведена с помощью рентгеноструктурного анализа, показывая, что каталитический остаток Cys150 легко окисляется до сульфинового кислоты (-SO₂-).

Во втором подразделе представлены результаты по исследованию модификации ГАФД из мышц кролика действием NO. Автор доказывает, что действие NO вызывает появление ацилфосфатазной активности ГАФД при

снижении её дегидрогеназной активности. То, что данный эффект возможен за счет образования цистеинсульфеновой кислоты в активном центре фермента, автор доказывает с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа, подтверждая модификацию Cys150 с образованием Cys-SOH при действии NO. При этом отмечается, что ГАФД, инактивированная DEANO на 80%, содержит не только 20% цистеинсульфеновой кислоты, но и неизвестный обратимый продукт (48%), который может включать SNO.

Для обнаружения ГАФД-SNO автором использован метод масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением - (ESI) анализ. ESI-масс-спектрометрия позволила обнаружить S-нитрозилированную ГАФД. Полученные результаты согласуются с данными MALDI-масс-спектрометрии. Автор демонстрирует, что инкубация ГАФД в присутствии донора NO DEANO приводит к образованию двух основных продуктов: S-нитрозилированной ГАФД (ГАФД-SNO) и S-сульфенированной ГАФД (ГАФД-SOH).

Полученные результаты Медведева М.В. подтверждает на рекомбинантной ГАФД человека, дополнительно показывая, что мутация C156S не препятствует S-нитрозилированию каталитического остатка Cys152, но существенно снижает содержание сульфеновой кислоты в активном центре ГАФД, предполагая, что это происходит вследствие быстрого окисления S-OH до SO₂H.

В четвертом подразделе автор проводит сравнительное исследование S-нитрозилированной и S-глутатионилированной ГАФД, делая вывод, что S-нитрозилирование ГАФД является относительно мягкой модификацией, которая сопровождается умеренными изменениями в третичной структуре и легко обратима в физиологических условиях в присутствии GSH или Grx1. Напротив, S-глутатионилирование ГАФД приводит к более выраженным изменениям в молекуле ГАФД по сравнению с S-нитрозилированием, что проявляется в большем снижении термостабильности и повышении

чувствительности к действию трипсина. S-глутатионилированная ГАФД гораздо менее обратима в физиологических условиях по сравнению с S-нитрозилированной ГАФД.

Следующий этап диссертационной работы связан с проверкой гипотезы, согласно которой S-нитрозилирование белков может способствовать их S-глутатионилированию в присутствии клеточного GSH. В экспериментах с вестерн-блоттингом автор успешно доказывает правомерность этого предположения, убедительно демонстрируя, что инкубация клеток с H_2O_2 и DEANO способствует S-глутатионилированию ГАФД. Кроме того, полученные автором результаты, позволяют ей выдвинуть предположение, что механизм S-глутатионилирования ГАФД под действием NO с участием цистеинсульфеновой кислоты, может быть применим и к бета-актину.

В последнем подразделе автор демонстрирует, что ГАФД обладает транснаитрозилирующей активностью по отношению к бета-актину, доказывая тем самым, что образованный в результате S-нитрозилирования нитрозоцистеин (CysSNO) может подвергаться гидролизу с образованием цистеинсульфеновой кислоты (Cys-SOH). Выдвигается предположение, что способность ГАФД нитрозилировать актин способствует редокс-регуляции сигнальных путей, контролируемых актином, и влиять на взаимодействие актина с актин-связывающими белками.

Диссертационная работа представляет собой полноценное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне, и имеет существенное теоретическое и практическое значение для дальнейших исследований в данной области, расширяя представления о механизме S-нитрозилирования ГАФД и последствий окислительного и нитрозативного стресса для взаимодействия ГАФД с другими белками.

Представленные в диссертации результаты получены на достоверном количестве экспериментального материала, что подтверждается соответствующим статистическим анализом. Выводы соответствуют полученным результатам.

Научная новизна полученных данных не вызывает сомнений. Автором впервые:

- установлен характер NO-модификации ГАФД и образование ГАФД-SNO и ГАФД-SOH.

- предполагаемая автором схема образования продуктов модификации ГАФД экспериментально подтверждена и показывает, что NO, как и H_2O_2 , приводит к сульфенированию ГАФД и бета-актина, что способствует их реакции с клеточным GSH с образованием соответствующих S-глутатионилированных белков.

Диссертация и автореферат структурированы и оформлены согласно требованиям нормативных документов. Содержание автореферата диссертации в полной мере отражает основные аспекты диссертационной работы. Цель, задачи, положения, выносимые на защиту и выводы, приведённые в автореферате, соответствуют таковым в диссертации.

Работа прошла необходимую апробацию. Ключевые положения диссертации опубликованы в 6 статьях рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК и индексируемых в базах РИНЦ, Scopus и Web of Science, 5 из которых - в журналах WoS с квартилем Q1. Материалы работы успешно представлены на международных научных конференциях.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Однако работа содержит незначительное количество опечаток. Также, в контексте обсуждения исследования возникли следующие вопросы:

- что можно сказать о скорости образования ГАФД-SOH из ГАФД-SNO? Какие факторы могут влиять на неё? Может она зависеть и как от уровня нитрозативного/оксидативного стресса и соотношения GSH/GSSG?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.1.10. – «Биомеханика и

биоинженерия», а именно следующим её направлениям «Инженерия белков, разработка принципов модификации и создания белков с ценными свойствами, протеомика, фолдинг белков (Биологические науки)», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Медведева Мария Витальевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. – «Биомеханика и биоинженерия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова,
Медицинский институт, Федеральное государственное
автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
Калинина Елена Валентиновна

14.11.2024

Контактные данные:

тел.: тел 8(495)7873803 доб.1987; e-mail: kalinina_ev@rudn.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защита диссертация: 03.01.04 - Биохимия

Адрес места работы: 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов им. Патриса
Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской
Федерации, Медицинский институт.

тел.: 8(495)7873803 доб.1987; e-mail: kalinina_ev@rudn.ru

Подпись д.б.н., профессора К

Ученый секретарь медици

к.фарм.н., доцент

14.11.2024

яю:

Т.В. Максимова