

ОТЗЫВ

официального оппонента
на диссертацию Бочковой Жанны Владиславовны
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. – «Биофизика»
на тему: «Изменение конформации и окислительно-восстановительного
состояния цитохромов дыхательной цепи митохондрий при
окислительном стрессе и патологиях»

Диссертационная работа Бочковой Жанны Владиславовны посвящена регуляции электрон-акцепторной активности цитохрома С дыхательной цепи митохондрий *in vivo* и *in vitro* в нормальных и патологических условиях. В настоящее время роль комплексов дыхательной цепи, как основного источника активных форм кислорода в клетке, вызывает пристальный интерес, однако пути регуляции электрон-транспортной активности комплексов, определяющей развитие окислительного стресса, требует дальнейшего изучения. В обсуждаемой диссертационной работе дается детальная оценка зависимости функционирования цитохрома С от конформации его гема, проведенная на основе экспериментов с изолированными белками, интактными митохондриями, кардиомиоцитами и целыми сердцами крыс. Чтобы показать принципиальное влияние конформации гема цитохрома С на акцептирование электрона от редокс-партнера, автор разработала не применявшуюся ранее методику на основе разностной спектроскопии комбинационного рассеяния с использованием мутантных форм цитохрома С и гем-содержащего белка нейроглобина в качестве донора электронов. Для выявления механизмов регуляции конформации гема цитохрома С в изолированных митохондриях был разработан метод на основе спектроскопии гигантского КР с использованием плазмонных серебряных наноструктур. Полученные с его помощью результаты, свидетельствующие о потенциал- и рН-зависимом

изменении конформации гема цитохрома С в митохондриях, детализируются благодаря комплексному применению оксиметрии и флуоресцентной микроскопии. Отдельный блок экспериментов посвящен обоснованию функциональной значимости нарушений регуляции конформации гема цитохрома С для работы дыхательной цепи в случае спонтанной гипертонии и гипоксического повреждения тканей сердца (патология ишемии/реперфузии изолированного сердца). Совокупно представленные результаты подтверждают новизну и актуальность работы. Приведенные методики на основе КР и ГКР спектроскопий для работы со взаимодействующими белками и интактными митохондриями перспективны для диагностических целей. Автор убедительно обосновала выносимые на защиту положения о том, что в нормально функционирующей митохондрии регуляция электронного транспорта на уровне цитохрома С посредством изменения конформации его гема носит комплексный характер и задействует как белковое микроокружение гема, так и макроусловия межмембранного пространства. Показано, что продолжительная гипоксия и системная сердечно-сосудистая патология характеризуются нарушением регуляции конформации гема в условиях, требующим повышенной активности дыхательной цепи. Диссертация соответствует критериям, установленным Положением, и соответствует специальности 1.5.2. «Биофизика» по направлению: биофизика клетки.

Диссертационная работа Бочковой Ж.В. написана по классической схеме и содержит следующие разделы: «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и Методы», «Результаты и обсуждения», «Выводы», «Список литературы», состоящий из 152 источников. Общий объем диссертации составляет 168 страниц и включает в себя 35 рисунков и 5 таблиц.

Раздел «Литературный обзор» включает четыре логически связанных блока. В первом приводится структура и классификация гемов, а также делается акцент на функциях и свойствах гем-содержащих белков:

цитохроме С и нейроглобине (содержит гем В-типа). Второй блок посвящен истории изучения конформации гемов, принципу классификации конформаций и их свойств. Здесь приводится подробный анализ новых данных о том, как белковая часть влияет на конформацию гема, и рассказывается о корреляциях между отклонениями конформации гема от плоскости и изменением окислительно-восстановительных свойств белков, выявленных на основе вычислительных моделей и мутантных цитохромов С-типа. Третий блок раскрывает теорию метода комбинационного рассеяния, его вариации, включая ГКР, и возможности применения для оценки редокс-состояния гем-содержащих белков и конформации их гемов в разных биологических системах. Четвертый блок акцентируется на комплексах электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) и внутриклеточных путях регуляции скорости транспорта электронов по дыхательной цепи. Отдельно анализируются последние данные о влиянии фосфорилирования цитохрома С на его апопототическую активность и эффективность переноса электронов с комплекса III на IV ЭТЦ.

В разделе «Методы» детально описаны протоколы экспериментов, используемые реактивы с указанием концентраций и оборудование. В каждом подразделе указаны способы получения всех исследуемых объектов (мутантных форм цитохрома С и нейроглобина, изолированных митохондрий, кардиомиоцитов и сердец крыс). Если объекты не были получены лично автором, указываются аффилированные лица, участвовавшие в работе. Подробно описан протокол и изображена схема эксперимента на основе КР-спектроскопии для регистрации изменений конформации гема цитохрома С, сопутствующих акцептированию электрона в редокс-реакции с нейроглобином. Приведен и обоснован метод анализа разностных спектров с помощью рассчитываемого параметра d – амплитуды разностных пиков. В подразделе, посвященном ГРК-спектроскопии и амперометрии суспензии нативных митохондрий детально описан протокол

регистрации усиленных КР спектров окисленного цитохрома С в межмембранном пространстве функционально активных митохондрий с помощью серебряных плазмонных наноструктур.

Раздел «Результаты и обсуждения» содержит 6 подразделов. В первом подразделе автор проводит сравнительный анализ конформационных свойств гемов диких типов окисленного цитохрома С и восстановленного нейроглобина с их мутантными вариантами, в которых были произведены единичные аминокислотные замены в сайтах связывания и в Ω -петле цитохрома С. Применение ГКР спектроскопии позволило зарегистрировать интенсивные спектры гемов окисленного цитохрома С, нейроглобина и их мутантных вариантов. В случае нейроглобина применение серебряных наноструктур также помогало снизить вклад автофлуоресценции в общую интенсивность спектра. Авторы показали, что только аминокислотные замены, изменяющие локальный заряд вблизи гемов С и В цитохрома С и нейроглобина соответственно, и нарушающие водородную связь между гемом нейроглобина и его белковым окружением, влияют на конформацию гемов С и В.

Во втором разделе проверяется предположение о том, что выявленные мутантные формы окисленного цитохрома С и восстановленного нейроглобина с измененными конформациями их гемов будут демонстрировать нарушение переноса электрона от нейроглобина к цитохрому С в отличие от мутантных форм с гемами, чьи конформации не отличаются от конформации гемов диких типов белков. Для этого использован комплексный протокол на основе разностной спектроскопии и установлены спектральные признаки нарушения редокс-реакции. Авторы убедительно показали, что предложенный ими метод может быть использован для качественного определения редокс-реакции между гем-содержащим белком-донором и цитохромом С по спектральным признакам изменения конформации гема цитохрома С. Было показано, что

снижение подвижности пирролов гемов С и В нативных белков, снижение вероятности плоской конформации их гемов препятствует эффективной редокс-реакции. В свою очередь перенос электрона сопровождается процессами, связанными с увеличением вероятности плоской конформации гема цитохрома С и его сдвигом в белковой щели. Авторы показывают, что эти процессы необходимы для акцептирования электрона.

В третьем разделе авторы исследуют изменение конформации гема цитохрома С в изолированных функционально активных митохондриях при изменении активности дыхательной цепи: в присутствии субстратов цикла Кребса и АДФ, активирующих электронный транспорт, а также при внесении блокатора комплекса I и ионофоров. Принципиальным нововведением стало использование плазмонных наноструктур для регистрации КР от единичных молекул окисленного цитохрома С митохондрий, что позволило напрямую оценить конформационные изменения гема цитохрома С в динамике при внесении разных субстратов и изменении разности потенциалов на внутренней мембране митохондрий и локальной концентрации протонов в межмембранном пространстве. Следует отметить, что “классическая” спектроскопия КР позволяет исследовать лишь гем восстановленного цитохрома С. Авторы продемонстрировали, что разработанная ими методика чувствительна к регистрации изменений конформации гема цитохрома С при разном потенциале на внутренней мембране митохондрий и рН в межмембранном пространстве. Выявленные закономерности позволяют утверждать, что потенциал-зависимая регуляция конформации гема цитохрома С служит механизмом оптимизации скорости электронного транспорта в дыхательной цепи, предотвращая избыточную генерацию супероксид-анион радикала и отвечая на динамично изменяющуюся потребность клетки в АТФ.

В четвёртом разделе результатов с помощью ГКР показано, что в митохондриях крыс с повышенным давлением на ранних стадиях развития

гипертонии изменяется морфология митохондрий, что сопровождается снижением чувствительности конформации гема цитохрома С к потенциалу на внутренней мембране. Если в митохондриях крыс с нормальным давлением вероятность плоской конформации гема цитохрома С увеличивается при снижении потенциала на внутренней мембране митохондрий, то в случае крыс со спонтанной гипертонией конформация гема не изменяется. Таким образом, приведённая методология может быть использована для анализа патологических изменений регуляции электрон-транспортной дыхательной цепи митохондрий на уровне цитохрома С.

В пятом и шестом разделах авторы с помощью КР-спектроскопии и флуоресцентной микроскопии оценивают редокс-состояние цитохромов и изменения конформации гема цитохрома С при разной продолжительности гипоксии и реоксигенации тканей целого сердца. Длительная гипоксия оказывает наибольшее влияние на состояние дыхательной цепи, приводя к стремительному и избыточному окислению её комплексов в ходе реоксигенации по сравнению с краткой гипоксией, а также быстрой оксигенации миоглобина. Авторы приводят согласующиеся литературные данные о том, что длительная гипоксия сопровождается нарушением эндотелия микрососудов, что увеличивает доступ кислорода к клеткам. Другим важным эффектом длительной гипоксии с последующей реперфузией является возросшая вероятность искаженной конформации гема цитохрома С по сравнению с предгипоксическим состоянием. В итоге, длительная гипоксия приводит к нарушению пост-реперфузионной регуляции активности дыхательной цепи. Серия кратких периодов гипоксии-реперфузии перед длительной гипоксией (так называемое гипоксическое preconditioning) предотвращает эти эффекты предположительно благодаря активации антиоксидантных систем клетки.

Несмотря на значимость полученных научных результатов и высокое качество их представления, в ходе ознакомления с текстом диссертации возникло несколько вопросов и хотелось бы сделать несколько замечаний:

1. В работе использовались ГКР подложки, протокол приготовления которых и их описание представлено в разделе 2.2.2. Диссертации (стр. 59-60). Подложки представляли собой иерархические наноструктуры из серебра. К сожалению в работе не приведены изображения морфологии полученных образцов, также как и спектры их отражения. В работе отсутствуют результаты оценки коэффициента усиления ГКР подложек с использованием красителя;
2. В работе сказано, что полученные ГКР подложки сохраняли стабильность в течении нескольких месяцев. Что означает стабильность? Под стабильностью в данном случае понимается неизменность коэффициента усиления ГКР подложек? Для ГКР подложек из серебра, в отличии от золотых ГКР подложек, как раз характерно изменение оптических и усиливающих свойств в течении времени;
3. В работе, хотя и редко, встречаются описки, например, стр. 62, 2 абзац, третья строка снизу "сстепенях окисления".
4. В работе использовались выделенные митохондрии, можно ли из проведенных экспериментов получить информацию об интервале времени в который следует работать с митохондриями с момента их выделения, с точки зрения получения воспроизводимых результатов КР измерений.

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 специальности 1.5.2. «Биофизика» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бочкова Жанна Владиславовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор по специальности биофизика,
профессор центра Фотоники и фотонных технологий Автономной
некоммерческой образовательной организации высшего образования
«Сколковский институт науки и технологий»

Горин Дмитрий Александрович

10.02.2025

Контактные данные:

тел.: 7(495)2801481 (дополнительный 3588), e-mail: D.gorin@skoltech.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.04 – «Физическая химия»

Адрес места работы:

143026, Россия г. Москва, территория инновационного центра Сколково, ул.
Нобеля, д.3., Автономная некоммерческая образовательная организация
высшего образования «Сколковский институт науки и технологии», центр
Фотоники и фотонных технологий Тел.: +7 (495) 280-14-81; e-mail:
admissions@skoltech.ru

Подпись профессора центра Фотоники и фотонных технологий Автономной
некоммерческой образовательной организации высшего образования
«Сколковский институт науки и технологии» Горина Дмитрия
Александровича удостоверяю:

10.02.2025

Подпись Горина Д.А.