

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Артюхова Артема Викторовича
на тему: «Разработка способов направленной регуляции дегидрогеназ
2-оксокислот млекопитающих и особенности такой регуляции в клетках
с разным типом метаболизма»
по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия»

Актуальность работы.

В современных условиях бурного развития новых экспериментальных технологий изучение клеточного метаболизма не только не теряет актуальности, но и переживает свое возрождение. Разработка инструментов для модуляции активности метаболических ферментов в различных клеточных и животных моделях является перспективным экспериментальным подходом для выявления молекулярных механизмов регуляции различных путей метаболизма в норме и патологии, а также для решения многих задач биоинженерии и прикладной биомедицины. Поэтому актуальность диссертационной работы Артема Викторовича Артюхова, посвященной поиску специфических ингибиторов тиаминдифосфат-зависимых дегидрогеназ 2-оксокислот и выявлению метаболических последствий их применения в клетках человека и животных, не вызывает сомнений.

Научная новизна и практическая значимость работы

В работе впервые проведен комплексный анализ способности различных фосфоновых и фосфиновых аналогов природных субстратов дегидрогеназ 2-оксокислот ингибировать их активности *in vitro*. Автором были охарактеризованы наиболее эффективные и специфические ингибиторы пируватдегидрогеназы, 2-оксоглутаратдегидрогеназы, 2-

оксоадипатдегидрогеназы и дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот. Далее данные ингибиторы использовали для изучения метаболических перестроек после подавления активности каждой конкретной дегидрогеназы в культурах клеток млекопитающих, а также после введения экспериментальным животным. Представители семейства дегидрогеназ 2-оксокислот в составе сложных мультиферментных комплексов катализируют реакции окислительного декарбоксилирования различных 2-оксокислот и имеют ключевое значение для регуляции таких важнейших метаболических процессов, как гликолиз, цикл Кребса и катаболизм аминокислот. Полученные в работе данные помогают более глубоко понять механизмы регуляции (в том числе, взаиморегуляции) отдельных метаболических путей, а также метаболизма в целом. Апробированные в работе новые инструменты для направленного фармакологического ингибирования дегидрогеназ 2-оксокислот могут быть использованы для разработки новых экспериментальных моделей различных патологических состояний.

Обоснованность и достоверность результатов, выводов и положений диссертации

Одним из главных критериев состоятельности научных данных является качество их представления научной общественности. Основные результаты работы многократно представлялись на российских и международных конференциях и были опубликованы в высокорейтинговых международных журналах. Список публикаций автора (15 печатных работ) впечатляет. Особенно стоит отметить оригинальные статьи, опубликованные в Scientific Reports, Frontiers in Chemistry и Pharmaceuticals, в которых Артем Викторович является первым автором. Также важно отметить, что все выводы, сделанные в работе, четко следуют из представленных результатов.

Общая характеристика работы

Диссертация А.В. Артюхова изложена на 170 страницах, содержит 7 таблиц и 33 рисунка. Работа построена по традиционному плану и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Основные результаты и выводы», «Благодарности», «Список литературы», содержащий 438 наименований и «Дополнительные материалы». Читать работу легко, поскольку она четко и логично структурирована и изложена прекрасным научным языком.

Введение дает полное представление об объекте и методах исследования, его актуальности и новизне, а также о теоретической и практической значимости результатов работы. В нем четко сформулированы цель и задачи работы, а также положения, выносимые на защиту. Помимо этого, характеризуются степень разработанности темы и личный вклад автора в проведении исследования.

В Обзоре литературы подробно описываются современные данные о структурных и механистических аспектах работы сложных мультиферментных комплексов тиаминдифосфат-зависимых дегидрогеназ 2-оксокислот, их роли в метаболизме и механизмах их регуляции в различных биологических системах. При этом особое внимание уделяется не так давно открытым и еще недостаточно охарактеризованным изоферментам 2-оксоглутаратдегидрогеназы (OGDH и DHTKD1) и пируватдегидрогеназы (PDHA2), а также изоформам данных ферментов, полученным в результате альтернативного сплайсинга. Две главы обзора из трех посвящены регуляции дегидрогеназ 2-оксокислот и метаболических путей с их участием низкомолекулярными соединениями. В них кратко представлена информация о фармакологическом потенциале тиамина, а также проводится тщательный анализ имеющихся литературных данных о фосфовых и фосфиновых аналогах различных 2-оксокислот в качестве синтетических ингибиторов дегидрогеназ 2-оксокислот. Обзор литературы производит очень хорошее впечатление и является полноценным теоретическим исследованием, которое

представляет интерес как для специалистов в данной области, так и для широкого круга читателей.

В главе «Материалы и методы» представлен широкий спектр экспериментальных подходов, используемых в работе – от классических биохимических методов приготовления и фракционирования экстрактов тканей и оценки кинетических параметров ферментативных реакций до современных экспериментальных подходов метаболомики и биоинформатики. Все экспериментальные процедуры описаны очень подробно, что позволит при необходимости их воспроизвести независимому исследователю.

Главы «Результаты» и «Обсуждение» содержат подробное описание выполненных экспериментов и их анализ. Первой большой задачей работы был поиск специфических ингибиторов пируватдегидрогеназы, 2-оксоглутаратдегидрогеназы и дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот, а также изофермента 2-оксоглутаратдегидрогеназы, кодируемого геном *DHTKD1*, который имеет специфическую 2-оксоадипатдегидрогеназную активность. В качестве потенциальных ингибиторов тестировались различные фосфоновые и фосфиновые аналоги природных субстратов (2-оксокислот) данных дегидрогеназ. Логично было бы проводить такой скрининг, используя в реакциях *in vitro* высокоочищенные гибридные белки, но ввиду сложной мультисубъединичной структуры комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот был выбран другой экспериментальный подход. В качестве экспериментальной модели автор использовал частично фракционированные экстракты, полученные из разных тканей крысы с учетом данных о тканеспецифичности экспрессии каждой конкретной дегидрогеназы. Анализ открытых баз данных транскриптомики и протеомики показал, что наибольшая экспрессия гена *DHTKD1*, кодирующего 2-оксоадипатдегидрогеназу, наблюдается в печени и практически отсутствует в сердце. Эти данные подтверждаются при помощи вестерн-блоттинга с

использованием специфических антител к белку DHTKD1. Экспрессия гена *OGDH*, кодирующего 2-оксоглутаратдегидрогеназу, в свою очередь, наблюдается как в печени, так и в сердце. Поэтому для изучения кинетических параметров ферментативных реакций 2-оксоглутаратдегидрогеназы и 2-оксоадипатдегидрогеназы были выбраны белковые фракции, полученные из экстрактов сердца и печени крыс. Автором был проведен комплексный кинетический анализ ферментативных реакций насыщения 2-оксоглутаратдегидрогеназы и 2-оксоадипатдегидрогеназы 2-оксосубстратами и ингибирования их фосфоновыми аналогами субстратов: сукцинилфосфонатом, адипоилфосфонатом и глутарилфосфонатом. Было установлено, что наиболее эффективным ингибиторами 2-оксоглутаратдегидрогеназы и 2-оксоадипатдегидрогеназы являются, соответственно, сукцинилфосфонат и адипоилфосфонат. Также было показано, что сукцинилфосфонат, адипоилфосфонат и глутарилфосфонат не влияют на активности пируватдегидрогеназы, дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот, а также других ферментов центрального метаболизма, трансформирующих 2-оксокислоты, что подтверждает специфичность действия данных ингибиторов. В серии подобных экспериментов с белковой фракцией, полученной из экстракта мозга крысы, проводимых в условиях насыщающей концентрации пирувата, было установлено, что наиболее эффективным ингибитором пируватдегидрогеназы является ацетилфосфинат. Причем, в контрольных экспериментах было показано, что данный синтетический аналог пирувата не ингибирует активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы и дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот. Для дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот специфического ингибитора обнаружить не удалось. Метилловый эфир изобутирилфосфоната наиболее эффективно ингибировал данную дегидрогеназу *in vitro*, однако в тех же концентрациях также значительно снижал активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы.

К данной части работы есть несколько вопросов и замечаний:

1) На Рисунке 6А представлены данные вестерн-блоттинга белка DHTKD1 в экстрактах, полученных из различных органов крысы. DHTKD1 детектируется в печени, почке и с большим трудом в головном мозге. В сердце, спинном мозге и скелетной мышце белок не детектируется, однако данные денситометрического анализа мембраны показывают, что, например, в спинном мозге белок есть и его экспрессия в 10 раз выше, чем в скелетной мышце. Может, для количественного анализа использовались другие экспозиции мембраны? Хотелось бы услышать комментарий автора по этому поводу. И еще один технический вопрос: подтверждали ли вестерн-блоттингом наличие других изучаемых ферментов в препаратах, которые использовали для анализа?

2) В работе это не обсуждается, однако у белка DHTKD1 есть вторая изоформа с молекулярным весом примерно 70 кДа, которая также детектируется используемыми в работе антителами (см. Рис. S1A). Уровни экспрессии второй изоформы в печени и сердце сравнимы и значительно превышают уровень экспрессии полноразмерного DHTKD1 (130 кДа) в печени (см. Рис. S1A). При помощи масс-спектрометрического анализа показано, что у данной изоформы сохранен каталитический домен, но отсутствует N-концевой фрагмент, необходимый для формирования полиферментного комплекса (Boyko, Artiukhov et al., 2020, doi: 10.1134/S0006297920080076). В этой статье авторы предполагают, что изоформа DHTKD1 70 кДа катализирует неокислительные превращения дикарбоновых 2-оксокислот, которые не требуют полиферментной структуры. Могут ли эти превращения субстратов и их синтетических аналогов (изучаемых ингибиторов) проходить в условиях проведения реакций *in vitro* с фракционированными экстрактами тканей крысы? Может ли это повлиять на интерпретацию полученных результатов, в том числе в последующих экспериментах с культурами клеток и крысами (в коре больших полушарий головного мозга изоформа 70 кДа также детектируется)?

3) Успешное использование активных комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот, реконструированных из рекомбинантных белков, описано в литературе. Были ли попытки наладить данную экспериментальную модель?

4) Похожий вопрос про использование экстрактов культивируемых клеток. Если их использовать в реакциях *in vitro*, то в клетках можно предварительно сверхэкспрессировать исследуемые дегидрогеназы, например, полноразмерную или укороченную изоформу DHTKD1, после чего смотреть, как это влияет на кинетику реакций насыщения субстратов и ингибирования аналогами.

5) Поскольку в дальнейших экспериментах ацетилфосфинат используется для изучения метаболических перестроек после направленного ингибирования пируватдегидрогеназы в культурах клеток, было бы полезно исключить его реактивность не только к 2-оксоглутаратдегидрогеназе и дегидрогеназе разветвленных 2-оксокислот, но и к другим ферментам, трансформирующим 2-оксокислоты или их структурные аналоги, как это сделано для сукцинилфосфоната, адипоилфосфоната и глутарилфосфоната.

Далее охарактеризованные *in vitro* синтетические аналоги 2-оксокислот использовали для изучения метаболических перестроек после направленного ингибирования соответствующих дегидрогеназ в культурах клеток млекопитающих. Для изучения метаболических последствий ингибирования 2-оксоглутаратдегидрогеназы и 2-оксоадипатдегидрогеназы сукцинилфосфонатом, адипоилфосфонатом и глутарилфосфонатом использовали клеточную линию аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с высокой экспрессией гена *DHTKD1* и клетки глиомы крысы C6 – с низкой экспрессией *DHTKD1*. Эксперименты по ингибированию пируватдегидрогеназы ацетилфосфинатом проводили на клеточных линиях глиобластомы U87, T98G и LN405. Среди наиболее выраженных метаболомных перестроек можно отметить падение уровня адипата после ингибирования 2-оксоглутаратдегидрогеназы в клетках MCF-7 и снижение

уровня глутарата в ответ на подавление активности 2-оксоадипатдегидрогеназы в клетках С6. После ингибирования пируватдегидрогеназы ожидаемо повышались уровни пирувата и аминокислот, распадающихся через пируват, тогда как уровни интермедиатов цикла Кребса, наоборот, снижались. Из неожиданных находок я бы отметил падение уровня никотиновой кислоты в клетках С6 после ингибирования 2-оксоадипатдегидрогеназы. Никотиновая кислота – деамидированная форма витамина В3 – один из основных предшественников NAD⁺. Также NAD⁺ может синтезироваться из хинолиновой кислоты, которая является продуктом расщепления триптофана по кинурениновому пути. 2-оксоадипат – альтернативный продукт расщепления триптофана. На основании этого автор высказывает предположение, что регуляция активности 2-оксоадипатдегидрогеназы может каким-то образом влиять на синтез NAD⁺. Накопление никотиновой кислоты в клетках с низким уровнем экспрессии 2-оксоадипатдегидрогеназы (С6) может происходить благодаря стимуляции пути расщепления триптофана до хинолиновой кислоты, что в свою очередь стимулирует синтез NAD⁺. Гипотеза очень интересная, но требует убедительного экспериментального подтверждения, поскольку пока не понятно, каким образом никотиновая кислота продуцируется в клетках, культивируемых в стандартных средах, содержащих в качестве предшественника NAD⁺ только никотинамид и триптофан. Также не ясно, почему именно она накапливается в экстракте при стимуляции синтеза NAD⁺, а не, собственно, NAD⁺, хинолиновая кислота или интермедиаты синтеза NAD⁺ из хинолиновой кислоты – NAMN и NAAD.

К данной части работы есть несколько вопросов и комментариев:

1) Была ли проведена оценка уровня экспрессии DHTKD1 в клетках MCF-7 и С6 при помощи вестерн-блоттинга? Если да, подтвердились ли разные уровни экспрессии и детектировалась ли в этих клетках укороченная изоформа белка 70 кДа?

2) В клетках разного происхождения как настройка метаболизма в целом, так и регуляция его отдельных путей могут очень сильно отличаться друг от друга, поэтому затруднительно сравнивать метаболические профили и их изменения после каких-либо воздействий в разных клеточных линиях. Также часто сложно разобраться, имеем ли мы дело с прямым или опосредованным эффектом какого-то низкомолекулярного ингибитора или стимулятора. Всегда возникает вопрос о том, как «активное вещество» попадает в клетку и в какой-то определенный клеточный компартмент (например, митохондрию), и как оно может метаболизироваться до «встречи» со своей мишенью. Работа с клеточными культурами позволяет при помощи технически несложных генетических манипуляций стимулировать и подавлять экспрессию генов. Данные манипуляции можно использовать для подтверждения эффективности и специфичности действия ингибиторов дегидрогеназ 2-оксокислот на выбранных клеточных моделях. Не рассматривал ли автор возможность использовать такой экспериментальный подход в работе?

3) Помимо ключевой роли в основных метаболических путях дегидрогеназы 2-оксокислот продуцируют ацетил-СоА (пируватдегидрогеназа), сукцинил-СоА (2-оксоглутаратдегидрогеназа) и глутарил-СоА (2-оксоадипатдегидрогеназа), которые необходимы, соответственно, для ацетилирования, сукцинилирования и глутарилирования белков. Данные пост-трансляционные модификации являются частью гистонового кода, а также регулируют функции самых разнообразных белков в клетке, в том числе, метаболических ферментов. Было бы интересно посмотреть, каким образом подавление активности дегидрогеназ 2-оксокислот влияет на изменения уровней данных модификаций у различных белков в клетке.

4) Было бы очень интересно соотнести метаболические перестройки, охарактеризованные в работе, с изменениями протеомных профилей после

направленного ингибирования исследуемых дегидрогеназ 2-оксокислот. Есть ли планы/возможности провести такой сравнительный анализ?

Заключительная часть работы посвящена выявлению метаболических последствий ингибирования пируватдегидрогеназы, 2-оксоглутаратдегидрогеназы и 2-оксоадипатдегидрогеназы *in vivo*. Крысам вводили апробированные ранее аналоги 2-оксокислот, а также их производные, которые лучше проникают в клетки, и анализировали в мозге животных изменения метаболических профилей аминокислот и других важнейших метаболитов, а также активностей дегидрогеназ 2-оксокислот и некоторых других ключевых метаболических ферментов. Краткосрочные эффекты ингибирования дегидрогеназ наблюдали через 24 часа после введения ингибиторов, отложенные – через 8 недель. Автором был охарактеризован широкий спектр биохимических перестроек в ответ на направленное ингибирование дегидрогеназ 2-оксокислот. Эти перестройки значительно варьировали в зависимости от ингибитора, его концентрации и времени, прошедшего после введения. Так, было установлено, что подавление активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы и пируватдегидрогеназы приводит к падению восстановительного потенциала глутатиона и изменениям концентрации внутриклеточного NAD^+ в коре головного мозга крыс. Ингибирование дегидрогеназ 2-оксокислот модулировало уровни различных аминокислот и активности различных ферментов. Интересно, что подавление 2-оксоглутаратдегидрогеназы приводило к компенсаторной стимуляции ее активности.

Вопросы и комментарии по данной части работы:

1) Почему была выбрана временная точка 24 часа для анализа краткосрочных эффектов аналогов 2-оксокислот? Была ли (будет ли) возможность оценить биодоступность ингибиторов в мозге и других органах после их однократного введения и, в целом, посмотреть кинетику их накопления в тканях и выведения из организма?

2) Значительные биохимические перестройки наблюдались в мозге крыс даже через 8 недель после введения ингибиторов. Какие, по мнению автора, молекулярные механизмы могут лежать в основе столь долгосрочных перестроек метаболизма? Есть ли планы их исследовать?

3) Помимо поиска эффективных ингибиторов дегидрогеназ 2-оксокислот и изучения метаболических последствий их применения в работе также проводится анализ метаболических перестроек в головном мозге крысы после введения животным тиамин – предшественника кофермента (тиаминдифосфата) и, соответственно, стимулятора дегидрогеназ данного семейства (см. пп. 4.6.4. и 4.6.5). Ни в положениях, выносимых на защиту, ни в выводах об этом не упоминается. Быть может, стоило более акцентированно представлять данную часть работы.

Заключение

Указанные замечания и предложения по развитию исследования ни в коем случае 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 03.01.08 – «Биоинженерия» (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 приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Артюхов Артем Викторович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия».

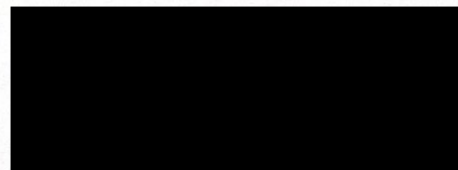
Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,

заведующий лабораторией клеточного метаболизма и сигналинга

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт
цитологии Российской академии наук»

Никифоров Андрей Анатольевич



13 мая 2022 г.

Контактные данные:

тел.: +7(812)297-5512, e-mail: andrey.nikiforov@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.25 – «Гистология, цитология, клеточная биология»

Адрес места работы:

194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., д. 4

Институт цитологии РАН, лаборатория клеточного метаболизма и
сигналинга

Подпись сотрудника Института цитологии РАН

А.А. Никифорова удостоверяю:

Заведующий канцелярией Института

