

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора
Института биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина -
обособленного подразделения
ФГБУН «Федеральный исследовательский
центр «Пущинский научный центр
биологических исследований Российской
академии наук»
кандидат биологических наук



А.В. Лисов

« 27 » февраля 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу
Аливердиевой Динары Алиевны

«Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия

Актуальность темы диссертационной работы

Актуальность проведенной работы имеет несколько аспектов. Несмотря на большое количество научных достижений, расшифровка механизмов транспорта соединений через биологические мембраны и структурно-функциональной организации белков-переносчиков остаётся по-прежнему не решенной. Большинство широко используемых прямых методов количественной оценки транспорта обладает рядом неустраненных до настоящего времени недостатков. Методические сложности, возникающие при измерении активности транспортных систем в биологических мембранах *in situ*, требуют совершенствования методов и используемых подходов. Кроме того, в связи с появлением штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам, одной из актуальных проблем современной биохимии и микробиологии является раскрытие механизмов действия антимикробных соединений на биологические мембраны. Некоторые природные пептиды, выделенные из ядов насекомых, а также продуцируемые микроорганизмами, эффективны при лечении инфекционных заболеваний, вызываемых устойчивыми к антибиотикам патогенами, являются перспективными противоопухолевыми агентами. Однако отсутствие знаний о механизме их действия на биологические мембраны существенно ограничивает их применение в клинической практике. В связи с вышесказанным, работа Аливердиевой Динары Алиевны, посвященная изучению особенностей порообразования антимикробными пептидами – аламетицином, мелиттином и мастопараном, а также изучению кинетических параметров

и структуры активного центра нативных дикарбоксилатных транспортеров с различными механизмами функционирования, несомненно, является актуальной.

Структура и содержание диссертации

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 510 литературных источников. Диссертация изложена на 324 страницах и содержит 78 рисунков и 10 таблиц. Изложение литературных данных и результатов исследований хорошо структурировано, подразделы логически связаны друг с другом и отражают порядок проведения работы.

Во введении автор обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи, характеризует научную новизну, теоретическое и практическое значение, приводит список положений, выносимых на защиту, сведения об апробации работы на научных форумах и о научных публикациях по теме диссертации.

Обзор литературы (глава I) начинается с описания традиционных методов исследования трансмембранного транспорта в интактных органеллах и клетках. Автором детально проанализированы известные подходы, описаны проблемы, связанные с изучением транспорта реконструированными белками-транспортерами, сильные и слабые стороны методов прямого измерения транспорта в клетках и препаратах субклеточных структур. Следующий раздел литературного обзора начинается с описания объектов исследования – митохондрий печени крыс и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обоснован выбор объектов исследования. Приведены литературные данные о транспортерах плазмалеммы дрожжей, митохондрий млекопитающих и дрожжей. Описаны основные характеристики некоторых пороформирующих пептидов и модели образуемых ими пор. Отдельное внимание уделено детальному описанию современных представлений о дикарбоксилатных транспортерах. Обсуждаются литературные данные о структуре транспортеров и механизмах транслокации субстратов. Обоснованы используемые в работе методические приемы. Таким образом, в литературном обзоре автором собран и проанализирован материал, непосредственно связанный с проблематикой диссертационного исследования и подтверждающий актуальность темы диссертации.

В главе Материалы и методы описаны объекты исследования, методы, оборудование и реактивы, достаточно детально изложены методические особенности и подходы, использованные при выполнении работы.

Глава Результаты и обсуждение содержит результаты собственных исследований, полученные автором, и разделена на 12 разделов. В первом разделе автором приводятся данные по разработке методических приемов изучения действия индукторов проницаемости на митохондрии печени крыс, дана оценка гомогенности и стабильности образующихся при этом митопластов. С использованием 2,2-дигексилмалоната, ингибитора дикарбоксилатного транспортера, было показано, что в опытах по изучению действия индукторов проницаемости на митохондрии примесь поврежденных митопластов незначительна, и ею можно пренебречь. Установлено, что калиевый трансмембранный ток пропорционален концентрации валиномицина и мелиттина в

мембране. Основываясь на полученных результатах, автором предложено использовать препарат митохондрий как биосенсор калиевого трансмембранного тока, индуцированного пептидами-пороформерами.

Второй раздел посвящен исследованию трансмембранного транспорта в препаратах митохондрий печени крысы и дрожжах *S. cerevisiae* с использованием эндогенных сопряженных систем (ЭСС) митохондрий (включающей дикарбоксилатный транспортер митохондрий, сукцинатдегидрогеназу и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу) и клеток (включающей переносчик дикарбоксилатов плазмалеммы, переносчик митохондрий, сукцинатдегидрогеназу и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу). Особое внимание автор уделил подбору условий для измерения низкой скорости окисления сукцината клетками *S. cerevisiae*: для радикального уменьшения уровня эндогенного (фонового) дыхания клеток проводили аэробную преинкубацию клеток при 0°C. На примере хорошо охарактеризованного в литературе транспортера пирувата автор делает вывод об эквивалентности прямого измерения концентраций пирувата в супернатанте и осадке энзиматическим методом и непрямого с использованием ЭСС методов измерения транспорта субстрата в дрожжевые клетки. Впервые показано, что транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован О-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Для изучения активного центра этого транспортера применен метод его зондирования с использованием двух рядов непроникающих конкурентных ингибиторов переносчика 2-алкилмалонатов и О-ацил-L-малатов. Непроницаемость плазматической мембраны *S. cerevisiae* для этих ингибиторов была проверена в специальных опытах. Показано, что пермеабиллизация мембран клеток *S. cerevisiae* с помощью диметилсульфоксида (ДМСО) существенно увеличивала накопление клетками ингибитора О-пальмитоил-L-малата, сделан вывод, что в неповрежденную клетку ингибитор не проникает.

Третий раздел содержит результаты изучения действия пороформеров аламетицина и мастопарана на интактные митохондрии печени крысы. Автору удалось впервые показать, что стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина, можно измерить на фоне проводимости его высокоолигомерных форм. Мерой оценки степени олигомерности канала служил размер проникающего катиона при измерении скорости дыхания митохондрий. Основываясь на полученных данных, было высказано предположение о том, что образованная алметицином пора содержит димеризованный пептид и липид. Аналогичным способом показано, что предпора мастопарана также является димером.

Четвертый раздел посвящен изучению нового транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*, дана его энзимологическая характеристика, показано влияние катионов на транспортную активность, зависимость от pH среды, субстратная специфичность (сукцинат, цитрат, фумарат, итаконат, малонат, L- и D-малат). Анализируя возможные виды механизма транспорта, автор достаточно обоснованно предположил механизм транспорта – неэлектрогенный унипорт.

Пятый, шестой и седьмой разделы посвящены изучению зондирования активных центров дикарбоксилатного транспортера митохондрий печени крысы и транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей с помощью амфифильных производных

субстратов: 2-алкилмалонатов, 2,2-диалкилмалонатов, О-ацил-L-малатов, α,ω -алкилендималонатов. Автору удалось также провести сравнение результатов зондирования активных центров этих двух транспортеров и сделать выводы о различиях в структуре каналов. В активном центре дикарбоксилатного транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae* выявлена протяженная (1,7 нм) липофильная область вблизи точки связывания двухзарядной головки ингибитора. Во внешнем полуканале дикарбоксилатного антипортера митохондрий печени крыс показана липофильная зона (1,2 нм), разделенная гидрофильной площадкой (0,4 нм). С использованием бифункциональных ингибиторов – α,ω -алкилендималонатов показано, что малат и малонат в митохондриальном переносчике имеют единую точку связывания.

В восьмом разделе сформулированы основные методические достижения и анализ новых свойств пороформеров, предложена обобщающая схема самоассоциации пептидов-пороформеров в сопрягающей мембране митохондрий. Автором предложено учитывать ряд свойств пороформеров при исследовании их действия на митохондрии, в том числе, коэффициент их распределения в мембране, критическую концентрацию, вызывающую лизис органелл, влияние на потенциал митохондрий. С помощью предлагаемого подхода автору удалось не только измерить катионный ток, индуцированный аламетицином при низких пептид/липидных соотношениях, но и разделить во времени стационарную проводимость фракции низкоолигомерных каналов и проводимость, индуцированную в митохондриях более широкими каналами этого пептида.

В девятом разделе обсуждены уникальные свойства нового транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*, проведено сравнение его свойств со свойствами известных в литературе транспортеров плазмалеммы дрожжей. Автором выявлены нехарактерные для транспортеров плазмалеммы грибов особенности: независимость транспорта от электрохимического градиента, способность транспортировать как сукцинат, так и цитрат, причем в дианионной форме, рН оптимум в щелочной области и рН зависимое модулирование активности однозарядными катионами (Na^+ , K^+ , Tris^+). Предполагаемый механизм транспорта – неэлектрогенный унипорт. Показана широкая субстратная специфичность переносчика (сукцинат, цитрат, фумарат, итаконат, малонат, L- и D-малат).

В десятом разделе автором проведено сравнение литературных данных о структуре и механизме функционирования ряда митохондриальных переносчиков с полученными в работе результатами зондирования активного центра дикарбоксилатного переносчика митохондрий печени крысы. Автор предположил, что стереоспецифичная к L-малату единственная субстратсвязывающая точка содержит две катионные группы и находится в просторной области, а два липофильных участка и разделяющая их гидрофильная зона – в узком канале, образованном липофильными трансмембранными сегментами.

В одиннадцатом разделе обсуждены результаты зондирования активного центра транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы, его липофильный профиль. Проведено сопоставление протяженности канала переносчика с длиной использованных для его изучения молекулярных зондов – конкурентных ингибиторов субстрата, положение субстрат-связывающей точки относительно канала в структуре переносчика. Опираясь на имеющиеся в литературе общепринятые модели каналов аденилатного транспортера

митохондрий и калиевого канала бактерии *E. coli*, автор обсуждает предполагаемые модели структурной организации и функционирования изучаемых в работе транспортеров.

В двенадцатом разделе обсуждены преимущества использования эндогенных сопряженных систем митохондрий (включающей дикарбоксилатный транспортер митохондрий, сукцинатдегидрогеназу и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу) и клеток (включающей переносчик дикарбоксилатов плазмалеммы, переносчик митохондрий, сукцинатдегидрогеназу и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу) по сравнению с традиционными прямыми методами измерения транспорта. Время измерения скорости в присутствии одной концентрации субстрата использованным автором непрямым методом составляет не более 5 мин. Возможность получить кинетические характеристики в одной оксиметрической кривой позволяла избежать ошибок, связанных с точностью определения количества органелл и клеток и точностью их добавления. Кроме того, в использованных интактных системах единообразие ориентации переносчиков не вызывает сомнений, а гомогенность популяции органелл или клеток поддается контролю.

В заключении кратко обобщены полученные экспериментальные данные, обоснованы положения работы.

Выводы, сформулированные в диссертации, логично вытекают из результатов проведенных исследований и являются в полной мере обоснованными и правомерными. Результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых международных и российских журналах.

Научная новизна полученных в работе результатов

Данная работа является вкладом в изучение механизмов трансмембранного транспорта в биологических мембранах. Впервые показано, что транспорт дикарбоксилатов через плазмалемму дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* опосредован переносчиком с нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Интересными представляются результаты использования амфифильных эффекторов при изучении кинетических параметров переносчиков *in situ*. Впервые для изучения активного центра нативного дикарбоксилатного транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae* применен метод зондирования канала с использованием конкурентных ингибиторов транспорта. Для двух транспортеров (митохондрий и плазмалеммы) с разным механизмом функционирования изучена структура их каналов вблизи точки связывания субстрата. Предложенный подход является весьма информативным и, несомненно, будет востребован в исследованиях механизмов трансмембранного транспорта биологических мембран.

Автором получены новые актуальные данные о механизме действия пороформирующих антибиотиков на митохондрии. Впервые показана прямая пропорциональная зависимость между относительной активацией дыхания митохондрий печени крыс и катионным током, индуцированным во внутренней мембране индукторами ионной проницаемости валиномицином и мелиттином, изучена скорость-лимитирующая стадия порообразования. При этом впервые показано, что стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкомолекулярной формой аламетицина, можно измерить на фоне проводимости его высокомолекулярных форм. Полученные в

работе экспериментальные результаты и предложенные подходы к изучению механизмов действия пороформирующих антибиотиков на митохондрии могут успешно применяться при тестировании новых антимикробных природных и синтетических соединений – потенциальных лекарственных препаратов.

Практическая значимость результатов

В диссертационной работе Аливердиевой Д.А. предложены и использованы различные экспериментальные подходы к решению поставленных задач. Научно-практическую ценность имеют разработанные или усовершенствованные методы использования амфифильных эффекторов, предложенная методология измерения нативных транспортеров в интактных системах. Проведенное автором зондирование активных центров переносчиков дикарбоксилатов с использованием конкурентных ингибиторов – производных субстратов, в отсутствие рентгеноструктурных данных о третичной структуре транспортеров ДКБ, является в настоящее время единственным источником детальной информации о структуре их активных центров. Кроме того, полученные автором результаты расширяют представление о механизмах возможного токсического действия пептидов-пороформеров и, безусловно, должны учитываться при разработке на их основе препаратов медицинского назначения.

Научная новизна и практическая значимость данной диссертационной работы не вызывает сомнений.

Обоснованность выводов

В диссертационной работе поставлено 5 основных задач, в соответствии с которыми сформулировано 5 положений, выносимых на защиту. По результатам исследований сформулировано 7 выводов. Выводы полностью соответствуют цели и задачам исследования, подтверждаются результатами исследований, являются научно обоснованными и правомерными. Все выводы диссертации сделаны на основе результатов большого количества тщательно подготовленных и проведенных экспериментов. Использование в исследованиях классических микробиологических, биохимических и современных молекулярно-генетических и физико-химических методов, подтверждает обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Д.А. Аливердиевой, а также выносимых на защиту положений и выводов. Диссертация представляет собой законченную работу, автореферат и опубликованные автором научные труды в достаточной мере отражают содержание диссертации.

Полнота изложения результатов диссертации в публикациях автора

Основные положения и результаты диссертационной работы отражены в автореферате и публикациях автора. По материалам диссертационной работы опубликовано 43 работы, в т.ч. 23 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, из них 21 – в научных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science. В соавторстве получен 1 российский патент на изобретение. Данные диссертации суммированы в обзорных статьях, а также включены

в книги зарубежных издательств. Рукопись автореферата соответствует содержанию диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Апробация диссертационной работы

Результаты и основные положения диссертационной работы Аливердиевой Д.А. «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» доложены и обсуждены на 25 российских и международных научных форумах, в том числе, Симпозиуме ESF-EMBO «Comparative genomics of eukaryotic microorganisms. Eucaryotic genome evolution, approaches with yeasts and fungi» (Каталония, Испания, 2005), III-м и IV-м Съездах Общества биохимиков и молекулярных биологов России (Санкт-Петербург, 2002 и Новосибирск, 2008), Московских международных научных конференциях «Биотехнология – окружающей среде» (Москва, 2004, 2005 и 2006), Московском Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2009), 2-м Международном конгрессе Биотехнология – 2011 (Филадельфия, США), IV-й международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2011 (Малага, Испания, 2011), V-ой международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroWorld2013 (Мадрид, Испания, 2013), 27-ой конференции FEBS/PABMB (Лиссабон, Португалия, 2001) Европейских Биоэнергетических конференциях (ЕБЕС) (Москва, 2006 и Дублин, Ирландия, 2008), 38-ой конференции FEBS (Санкт-Петербург, 2013) и 39-ой конференции FEBS-EMBO (Париж, Франция, 2014), VI конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015 (Барселона, Испания, 2015), VI Съезде биохимиков России (Сочи, 2019), VII-м Съезде биохимиков России и X-м Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Сочи–Дагомыс, 2021).

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

1. В работе предложено использовать ферментативные системы окисления субстратов в препаратах митохондрий и клеток качестве эндогенных сопряженных систем для изучения трансмембранного транспорта моно-, ди- и трикарбоновых кислот. Очевидно, что предложенный подход имеет ограничения. Какие именно ограничения, по мнению автора, имеет предложенный подход при изучении транспортеров митохондрий и плазмалеммы? Возможно ли изучение других переносчиков плазматической мембраны дрожжей с использованием этого подхода?
2. Интересно мнение автора о перспективе применения ингибиторного анализа для изучения структуры каналов нативных переносчиков в биологических мембранах.

Высказанные замечания и вопросы не носят принципиального характера, не затрагивают основных результатов и выводов диссертации, и не снижают общего положительного впечатления от работы. Автореферат отражает основную информацию, представленную в диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Аливердиевой Динары Алиевны на тему: «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия, является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, имеющей научно-практическое значение. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, изложенным в Положении о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции) «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Аливердиева Динара Алиевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия.

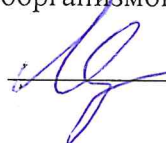
Отзыв ведущей организации на диссертацию Аливердиевой Д.А. обсужден, одобрен и утвержден на открытом семинаре лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (протокол № 1 от 20.02. 2023 г.)

Отзыв составил

доктор биологических наук (по специальности 03.00.04 Биохимия)

ведущий научный сотрудник

Лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов

 Моргунов Игорь Григорьевич

Подпись Моргунова Игоря Григорьевича заверяю

доктор биологических наук

Ученый секретарь

ИБФМ РАН



 Решетилова Татьяна Анатольевна

27.02.2023

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИБФМ РАН)

Почтовый адрес:

142290, Московская область, г. Пущино, пр-кт Науки, д. 5

Эл. почта: adm@ibpm.ru; <http://www.ibpm.ru>; тел./факс: (4967)-73-39-62