

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Кудрявцева Дениса Сергеевича «Новые низкомолекулярные и пептидно-белковые лиганды Cys-петельных рецепторов»** на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология

Изучение различных молекулярных аспектов функционирования нервной системы занимают все большее и большее место в молекулярно-биологических исследованиях. Классическим объектом исследований в этой области является синаптическая передача, изучаемая уже в течение многих десятилетий. Работы последних лет привели к значительному расширению нашего понимания механизмов этого важнейшего процесса. Получены трехмерные структуры различных ее участников, охарактеризованы лиганд-рецепторные взаимодействия, в ряде случаев стало возможным предсказание структуры наиболее активных лигандов. Все эти достижения определили значительный прогресс не только в области фундаментальных исследований, но и в сфере практической медицины.

Следует заметить, что, несмотря на все вышесказанное, в этой области все еще остается немало «белых пятен». Одним из наиболее интересных объектов в этой области для биохимиков и молекулярных биологов являются лиганд-управляемые ионные каналы, непосредственно преобразующие химический сигнал в ток и представляющие собой белковые мультимеры, содержащие участок связывания лиганда. Работа Д.С.Кудрявцева посвящена исследованиям Cys-петельных рецепторов - группе лиганд-управляемых ионных каналов, объединяющая никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), ионотропные рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-А) и некоторые другие. Именно эта группа у высших организмов ответственна за поляризацию/деполяризацию постсинаптической мембраны, определяющую развитие большого числа как нормальных физиологических процессов, так и различных патологий. Учитывая огромное значение данной тематики, а также изложенное выше, следует признать диссертационную работу Д.С.Кудрявцева весьма своевременной и актуальной.

Диссертационная работа Д.С.Кудрявцева посвящена поиску и функциональной характеристике новых лигандов Cys-петельных рецепторов различной природы. Работа изложена на 75 стр. текста, построена по классической схеме и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы (136 наименований). Литературный обзор в сжатой форме описывает Cys-петельные рецепторы из различных источников. Несмотря на небольшой объем обзора (24 стр.), мне он представляется удачным и читается с интересом, поскольку достигается главная цель – читатель может найти ссылки на самые последние работы в этой области. Концентрированное изложение проблемы, на мой

взгляд, гораздо лучше принятого во многих диссертациях пересказа содержания оригинальных статей.

Из представленного описания Материалов и методов очевидно, что Д.С.Кудрявцев является зрелым специалистом, владеющим значительным спектром современных методик. Это и электрофизиологические методы, являющиеся основными для этой тематики, и методы клеточной визуализации, и молекулярное моделирование. В качестве замечания, однако, следовало бы отметить слишком краткий характер раздела. Действительно, он занимает всего три страницы, вследствие этого практически отсутствуют описания многих методик, в частности выделения токсинов, пептидного синтеза и т.д. Между тем, такого рода описания были бы полезны, особенно для читателя, не слишком хорошо знакомого с предметом.

В разделе «Результаты и обсуждение», автор последовательно описывает решение поставленных задач. На первом этапе совместно с несколькими лабораториями ТиБОХ ДВО РАН была проанализирована активность четырнадцати произвольно выбранных соединений из морских губок, асцидий и моллюсков (как известно, морские организмы представляют собой практически неисчерпаемый источник физиологически активных веществ). Вот и в данном случае исследуемые низкомолекулярные соединения были весьма разнообразны по природе - сфинголипиды, алкалоиды, пигменты, производные дофамина, пиримидина и гуаниина. При этом автор, наряду с электрофизиологическими методами и радиолигандным анализом, широко применял и методы компьютерного моделирования, причем наблюдалось неплохое соответствие между результатами расчетов и параметрами, полученными в эксперименте. В результате было показано, что все соединения в той или иной степени взаимодействуют с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR), а для некоторых из них наблюдалось сродство в микромолярном диапазоне к мышечному и/или $\alpha 7$ нейрональному типу рецептора.

Следующим этапом работы было исследование взаимодействия Суз-петельных рецепторов с пептидными лигандами. Опираясь на структуру аземиопсина, описанного ранее в Институте первого пептидного ингибитора nAChR, не содержащего дисульфидных связей, был синтезирован набор последовательных его пятичленных фрагментов, полностью перекрывающих исходную аминокислотную последовательность. Целью работы было выявление минимального фрагмента структуры аземиопсина, сохраняющего функциональную активность. В результате был выявлен фрагмент структуры WWPKP, IC₅₀, которого составило 138 мкМ, что в сравнении с полноразмерным аземиопсином хуже на три порядка. Данный пентапептид, таким образом, является относительно низкоаффинным ингибитором мышечного nAChR, но, с другой стороны, может быть легко

и с высоким выходом синтезирован, в том числе и в промышленном масштабе, что представляет интерес как основа для создания новых ингибиторов этого рецептора.

«Классическими» пептидными лигандами nA_{ChR} различных подтипов являются α -конотоксины. Несмотря на широкое разнообразие таких лигандов, создание новых α -конотоксинов, обладающих улучшенными свойствами по сравнению с исходными молекулами, по-прежнему является актуальной задачей. Автор провел тестирование биологической активности трех мутантных форм α -конотоксина PnIA, полученных ранее в лаборатории, в отношении $\alpha 7$ nA_{ChR}. Выбор мутантов определялся на основании компьютерного моделирования связывания лиганд-рецептор. Все три пептида показали ингибирующую активность по отношению к данному рецептору и практически идентичные константы ингибирования. Все три пептида продемонстрировали значительно более высокое (примерно в 10 раз) сродство к $\alpha 7$ nA_{ChR}, чем исходный конотоксин, что свидетельствовало о правильности компьютерной модели.

Заключительная часть работы Д.С.Кудрявцева посвящена изучению взаимодействия Cys-петельных рецепторов с лигандами белковой природы. Наиболее интересные результаты были получены в системе взаимодействия серии белковых нейротоксинов из ядов змей- α -кобротоксином и α -бунгаротоксином с ионотропными рецепторами γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-А). Ранее в Отделе молекулярных основ нейросигнализации ИБХ РАН были получены флуоресцентные производные α -кобротоксина и α -бунгаротоксина. Д.С.Кудрявцев провел прямую цитохимическую оценку связывания этих лигандов в клетках Neuro 2a и НЕК 273, трансфицированных генами ГАМК-А с субъединичными составами $\alpha 1\beta 3$ и $\alpha 1\beta 3\gamma 2$. Было показано, что и показано, что α -кобротоксин и α -бунгаротоксин различаются по специфичности в отношении различных подтипов этого рецептора.

Все вышеперечисленное свидетельствует о высоком уровне работы. К числу ее недостатков следует, на мой взгляд, отнести недостаточную продуманность выводов. Так, вывод 1 является общим, дублируется остальными выводами и не несет смысловой нагрузки. Вывод 6 также неконкретен и мог бы быть сформулирован по-иному. Однако данные недостатки не умаляют в целом положительного впечатления от этой сильной работы.

Результаты и выводы диссертационной работы Д.С.Кудрявцева прекрасно представлены в печатных работах – 6 статей, входящих в перечень WoS из них 5 - в международных журналах. Полученные данные апробированы на 4 российских и международных конференциях.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертационной работы.

На основании текста диссертации и автореферата можно заключить, что диссертационная работа Д.С.Кудрявцева является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся решения нескольких задач, важных для развития молекулярной биологии и биохимии. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне и обладает практической и теоретической значимостью с точки зрения возможного использования полученных результатов. Считаю, что диссертационная работа Д.С.Кудрявцева полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Кудрявцев Денис Сергеевич, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Главный научный сотрудник,
заведующий Лабораторией молекулярных основ действия
физиологически активных соединений,
докт. хим. наук, член-корреспондент РАН, профессор



С.Н.Кочетков

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Тел. +7(499) 135-05-90 e-mail: kochet@eimb.ru

11 сентября 2016 г.

