

## Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Кудрявцева Дениса Сергеевича “Новые низкомолекулярные и пептидно-белковые лиганды Cys-петельных рецепторов”, представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология

Исследование функциональных свойств, структурной организации и механизмов блокады различных ионных каналов, несомненно, весьма значимая задача современной молекулярной биологии и физиологии. Хорошо известно, что нарушение работы ионных каналов, приводит к сбою жизненно важных клеточных процессов, что, в свою очередь, проявляется на организменном уровне в виде тяжелых заболеваний.

Семейство лиганд-управляемых ионных каналов с цистеиновой петлей к которым относятся никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), рецептор серотонина третьего типа (5OT-3), ионотропные рецепторы  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК-A) и глициновый рецептор (ГлиR), в этом случае не являются исключением. Они широко представлены как в центральных, так и периферических отделах нервной системы позвоночных, и имеют преимущественно синаптическую локализацию. Активируясь в ответ на связывание с нейромедиатором, эти каналы способны пропускать ионы  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , а некоторые из них ионы  $\text{Cl}^-$ . Ввиду всех вышеперечисленных фактов, неудивительно, что каналы этого семейства вовлечены во многие нормальные и патологические физиологические процессы. Соответственно, поиск и изучение избирательных модуляторов Cys-петельных рецепторов представляются крайне важными, поскольку помогут расширить набор фармакологических инструментов и более конкретно ответить на вопросы о физиологической роли этих каналов, механизмах их функционирования, специфике локализации в нервной системе и другие. Диссертационная работа Д.С. Кудрявцева представляет именно это комплексное направление.

Диссертация объемом 75 страниц написана по общепринятому плану. Она состоит из введения, обзора литературы, раздела, посвященного материалам и методам, использованным в работе, главы, объединяющей описание полученных результатов с их обсуждением, заключения, выводов и

библиографии, насчитывающей 136 ссылок. Работа иллюстрирована 23 рисунками и содержит 3 таблицы.

В разделе Введение автор обосновывает актуальность выбранной темы.

Обзор литературы написан четким и ясным языком, содержит лаконичное описание современных представлений о топологии и субъединичном составе Cys-петельных рецепторов, приведены данные о локализации каналов и их участии в физиологических процессах в норме и патологии. Отдельный раздел отведен данным, о известных эндогенных лигандах и модуляторах данных рецепторов, а также биологически-активных соединениях регулирующих активность каналов. В заключение автор формулирует цели исследования. Обзор показывает, что автор хорошо разбирается в тематике работы, и готовит читателя к восприятию полученных результатов.

В следующем разделе описаны использованные в работе материалы и методы. Методическая часть работы, безусловно, сильная: автор применил современные методы, такие как молекулярный докинг, молекулярное моделирование и электрофизиологические подходы.

Раздел результаты посвящен собственно полученным в ходе выполнения экспериментальной части работы данным и их обсуждению.

Кудрявцевым Д.С. проведено сравнение констант ингибирования для взаимодействия с АхСБ для 14 произвольно выбранных соединений из морских губок, асцидий и моллюсков, полученных с помощью теоретического предсказания (компьютерный докинг) и полученных экспериментальным путем (радиолигандный метод). Показано, что для соединений с наибольшей аффинностью результаты компьютерного докинга показали хорошую согласованность с данными конкуренции с радиолигандом. С помощью электрофизиологических подходов проверено функциональное действие данных соединений. Показано, что соединения из морских губок и асцидий могут обладать ингибирующей активностью по отношению к нейрональному nAChR  $\alpha 7$  подтипа и nAChR мышечного подтипа. Далее автором была предпринята попытка выявления ингибирующей активности пятичленного фрагмента пептида аземиопсина, первого пептидного ингибитора nAChR, не содержащего дисульфидов. Найденный пентапептид WWPKP - лиганд мышечного nAChR с сродством 138 мкМ вряд ли можно назвать



высокоспецифичным, потеря активности в сравнении с полноразмерным аземиопсином составила три порядка. Следующей задачей исследования было создание новых  $\alpha$ -конотоксинов, обладающих улучшенными свойствами по сравнению с исходными молекулами. Проведенные замены аминокислотных остатков  $\alpha$ -конотоксина PnIA, направленные на улучшение сродства к  $\alpha 7$  nAChR: PnIA[R9], PnIa[R9, L10], PnIa[R5, R9, L10, R14] показали, что новые аналоги  $\alpha$ -конотоксина PnIA имеют значительно более высокое сродство к  $\alpha 7$  nAChR ( $IC_{50}$  10-30 нМ), чем исходный конотоксин. Далее автором была предпринята попытка установления аминокислотных остатков nAChR, ответственных за взаимодействие с водорастворимым аналогом эндогенного трехпетельного «прототоксина» - белком Lynx1. Показано, что введение мутации  $\alpha 7$  nAChR Y168A улучшает сродство к ацетилхолину. Таким образом получена первая информация о расположении его аллостерического участка связывания. Последняя часть работы посвящена проверке влияния трехпетельных токсинов на функциональную активность ГАМК-А рецепторов, различного субъединичного состава. Показано, что  $\alpha$ -кобратоксин и  $\alpha$ -бунгаротоксин различаются по специфичности в отношении различных подтипов ГАМК-А рецептора. Автором впервые обнаружено ингибирование ГАМК-А рецепторов некоторыми  $\alpha$ -конотоксинами, признанными блокаторами nAChR.

В целом про работу Д.С. Кудрявцева можно сказать, что она представляет собой хорошо продуманное научное исследование, открывающее дальнейшие перспективы в изучении биологической активности лигандов Cys-петельных рецепторов. Экспериментальная реализация работы не вызывает серьезных нареканий. Методические подходы и результаты, полученные автором, могут быть применены в работе Учреждений Российской академии наук: Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта, Институте цитологии РАН, Институте физиологически активных веществ РАН, других научно-исследовательских учреждений, а также при обучении студентов биологической, химико- и медико-биологической специализаций.

Выводы диссертации в подавляющем большинстве достаточно четко сформулированы и соответствуют представленному экспериментальному материалу.

Результаты работы полно опубликованы в 5-ти зарубежных, 1-ой российской статьях и 4-х тезисных сообщениях.

Работа в целом написана хорошим языком, с малым количеством опечаток и стилистических погрешностей.

Однако при внимательном знакомстве с диссертацией возникает ряд вопросов и замечаний, которые требуют разъяснения :

- 1) Несмотря на отмеченную выше четкость в написании литературного обзора, необходимо отметить удивительную лапидарность, которая зачастую не позволяет понять связь обзора с основным содержанием работы.
- 2) Раздел «Материалы и методы» -
  - а) нет даже упоминания о радиолигандном тесте, используемом в работе.
  - б) Описание используемых электрофизиологических методов недостаточно – не указаны ни используемые растворы, ни поддерживаемые потенциалы. Для метода whole-cell описание просто отсутствует.
  - в) Исследование основано на работе с экспрессированными гетероолигмерными рецепторами, однако не представлены, используемые протоколы трансфекций и инфекций.
  - г) Отсутствует раздел «Статистический анализ».
- 1) Раздел «Результаты и обсуждение»
  - а) Каким образом контролировали экспрессию nAChR нужного субъединичного состава?
  - б) Зачем был использован химерный рецептор  $\alpha 7$ /GlyR? Что конкретно можно сказать о действии 6-бромогипафорина на различные подтипы nAChR?
  - в) В работе использовалась временная трансфекция клеток Neuro2A, каким образом выбирали клетки для экспериментов?
  - г) Крайне небрежно представлены данные электрофизиологии, на многих рисунках упущены сведения о амплитудах и длительностях ответов. Нет ни одного рисунка, на котором можно было бы оценить качество электрофизиологических измерений. Каким образом проводили нормализацию токов?



д) Рис. 11 диссертации (он же рис.5 автореферата). По оси ординат отложено ингибирование в %. Нигде не указано как определялось ингибирование мышечного nAChR.

е) отсутствует внятная подпись к рис.20.

ж) Вывод №1 не несет никакой конкретной информации и по сути не является выводом.

з) Четвертый вывод, в котором автор декларирует улучшение аффинных свойств мутанта конотоксина по сравнению с диким типом звучит не вполне корректно. Необходимо было привести данные по количественному сравнению непосредственно в тексте вывода.

В представленной работе есть достаточно курьезные небрежности. Так важный раздел литературного обзора «Физиологические эффекты лигандов Cys-петельных рецепторов» состоит всего из двух предложений, одно из которых гласит, что лиганды оказывают большое влияние на протекание физиологических процессов, а второе утверждает, что поэтому необходимо искать новые лиганды. В автореферате, в списке опубликованных статей, в статьях № 4 и № 5, отсутствуют ключевые соавторы. Нет ссылок на свои собственные статьи, поэтому крайне неудобно искать, какой материал, где опубликован.

Приведенные замечания относятся в основном к форме изложения и представлению результатов. Принципиальных замечаний по полученным результатам у меня нет. Отмеченные недостатки не снижают высокой научной ценности работы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Кудрявцева Д.С. «Новые низкомолекулярные и пептидно-белковые лиганды Cys-петельных рецепторов» по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня. Диссертационная работа Д.С. Кудрявцева полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям и изложенным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09

2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07 2014 г. № 723), а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Доктор биологических наук

Е.В. Казначеева

Заведующая лабораторией Ионных каналов  
Клеточных мембран Института цитологии РАН

Федеральное государственное учреждение «Институт цитологии РАН»  
Почтовый адрес: Тихорецкий проспект, д. 4, 194064, Санкт-Петербург,  
Россия

Телефон: (812)297-14-97.

Адрес электронной почты: evkazn@incras.ru

*Подпись руки Е.В. Казначеевой заверяю:*

Ученый секретарь Института цитологии РАН,  
канд. биол. наук



  
И.И. Тюрьева

«26» сентября 2016 г