

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии гена Российской академии наук

(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: +8(499)135-60-89, +8(499)135-98-84 Факс: +8(499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

05.10.2020 г. № 12318 – 242/1

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института биологии
гена Российской академии наук

_____ академик П. Г. Георгиев



Отзыв ведущей организации

На диссертацию Владимира Василия Игоревича «Роль кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторной системе», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Актуальность исследования.

Диссертация Владимира Василия Игоревича «Роль кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторной системе» посвящена интересной, важной и актуальной проблеме – изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе кальциевой чувствительности нейрональных кальциевых сенсоров (НКС). НКС – высокоспецифичные кальций-связывающие белки, определяющие активность ряда внутриклеточных ферментов и, тем самым, регулирующие функционирование клетки в широком диапазоне концентрации кальция. Одним из факторов, влияющих на кальциевую чувствительность НКС, является основной

регуляторный белок рафт-структур – кавеолин I. Известно, что кавеолин I широко экспрессируется в наружных сегментах фоторецепторных клеток, где расположена система генерации и передачи зрительного сигнала. В связи с вышесказанным, актуальность изучения роли кавеолина I в регуляции функционирования зрительной системы не вызывает сомнения.

Целью данного исследования является изучение функциональной роли кавеолина I как потенциального партнера и регулятора Ca^{2+} -зависимой сигнальной активности НКС фоторецепторных клеток.

Для достижения цели автор поставил пять задач, включающих (1) исследование возможности совместной локализации и взаимодействия кавеолина I с белками НКС; (2) получение очищенных препаратов миристоилированных форм рекомбинантных НКС, а также индивидуальных функциональных доменов кавеолина I и определение параметров их взаимодействия; (3) идентификация сайта связывания кавеолина I в структуре НКС; (4) исследование влияния кавеолина I на функциональные свойства НКС; (5) изучение влияния условий окислительного стресса клеток на взаимодействие НКС с кавеолином I.

В ходе выполнения работ Владимиром В.И. выявлен новый белковый партнер НКС. Охарактеризованы стабильные комплексы НКС - кавеолин I, участвующие в Ca^{2+} -зависимой регуляции функционирования зрительной системы в норме и в условиях окислительного стресса. В целом, результаты работы вносят существенный вклад в понимание механизмов, отвечающих за прием и передачу кальциевых сигналов.

Структура диссертации.

Диссертация построена по стандартному плану, изложена на 120 страницах и состоит из Введения, глав: Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы, включающего 170 источников.

Содержание диссертации.

Во введении приведены обоснование темы диссертации, актуальность, научная новизна и практическая значимость исследования, положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы включает несколько разделов. Он хорошо структурирован, написан логично и содержит большой объем современной информации. В обзоре подробно рассматриваются сведения о структуре клеточных мембран, кальциевых каналов и фоторецепторной сетчатки. Приводится исчерпывающая характеристика кальций-связывающих белков зрительной системы и белков семейства кавеолинов.

Приведенный материал достаточно глубоко изложен и дает представление о механизмах функционирования зрительной системы.

В разделе «Материалы и методы» приводятся использованные в работе методические процедуры. Высокий методический уровень – важное достоинство диссертации. В работе использовано большое число современных молекулярно-биологических и биохимических методов. Достаточное количество контролей и статистический анализ позволяют не сомневаться в достоверности полученных результатов.

В разделе «Результаты и обсуждение» изложены полученные экспериментальные результаты и их анализ. Основной результат диссертации – выявление новой регуляторной функции интегрального белка мембранных рафт-структур кавеолина I в отношении белков семейства НКС зрительной системы. В начале работы диссертантом установлено, что белки НКС: рековерин, NCS-1, GCAP1 и GCAP2, локализуются в фоторецепторных рафт-структурах совместно с кавеолином I. Были выделены и охарактеризованы стабильные Ca^{2+} -зависимые комплексы этих белков с цитоплазматическим участком кавеолином I. В продолжении этого исследования были выявлены структурные фрагменты белков, ответственные за образование этих комплексов. В.И. Владимировым установлено, что связывание бескальциевой формы рековерина с кавеолином I происходит с участием структурного сайта, формирующегося в его С-концевом домене.

Далее диссертантом исследована функциональная активность комплекса НКС с кавеолином и установлено, что образование комплексов стимулирует сигнальную активность белков, входящих в состав этих комплексов. Обнаружена активация фоторецепторной гуанилатциклазы, а также фосфорилирование зрительного рецептора родопсина под действием CRK-1. В условиях окислительного стресса рековерин способен окисляться по остатку цистеина и образовывать дисульфидный димер, повышая стабильность его комплекса с кавеолином I.

Выводы сформулированы четко и обоснованно, вытекают из результатов исследования. Автореферат диссертанта Владимирова В.И. содержит все необходимые данные о поставленной научной задаче, ее актуальности и ее решения в рамках работы.

Научная новизна исследования.

В работе подробно охарактеризована новая регуляторная функция интегрального белка мембранных рафт-структур кавеолина-1 в отношении белков семейства НКС зрительной системы. Было показано наличие взаимодействий между кавеолином-1 и

белками семейства НКС, определены кинетические и равновесные параметры этих взаимодействий. Определен сайт связывания кавеолина-1 в структуре НКС. Показано влияние кавеолина-1 на Ca^{2+} -чувствительность и другие функциональные свойства НКС. Впервые продемонстрировано влияние мутации кавеолина-1 Y14E на его взаимодействие с НКС. Впервые обнаружено образование окисленных форм рековерина в условиях окислительного стресса *in vivo* и охарактеризовано взаимодействие кавеолина-1 с указанными формами. Кроме того, разработана новая методика получения рекомбинантных НКС, включающая разделение миристоилированной и немистоилированной форм этих белков.

Теоретическая и практическая значимость работы.

В ходе выполнения работы установлен новый белковый партнёр НКС – кавеолин-1. Полученные результаты позволяют предположить участие сигнальных комплексов НКС-кавеолин-1 в Ca^{2+} -зависимой регуляции функционирования зрительной системы в норме, а также в условиях окислительного стресса, сопряженного с развитием ряда офтальмологических заболеваний. В целом, результаты работы вносят существенный вклад в понимание механизмов, отвечающих за прием и передачу кальциевых сигналов, являющихся одним из самых распространённых типов внутриклеточной сигнализации. Понимание механизмов aberrантной сигнальной активности комплексов НКС-кавеолин-1 может служить основой для создания новых подходов к терапии нейродегенеративных и нейроофтальмологических заболеваний.

Замечания по работе.

Работа не лишена недостатков, однако они касаются не существа работы, а ее оформления: это неудачные выражения, опечатки, иногда очень мелкие подписи к рисункам. Эти недостатки не умаляют ценности диссертационной работы.

Заключение.

Диссертационная работа Владимирова Василия Игоревича «Роль кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторной системе», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия», является завершённой научно-квалификационной работой, которая по своей новизне, актуальности и достоверности полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям согласно «Положению о присуждении ученых степеней» (утверждено

Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а ее автор Владимир Васильевич заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории молекулярной иммуногенетики рака 30 сентября 2020 года (Протокол №1).

Главный научный сотрудник лаборатории молекулярной иммуногенетики рака
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена
Российской академии наук

Д.б.н., профессор Сащенко Сащенко Лидия Павловна

Сведения о составителе отзыва: Сащенко Л.П. – доктор биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Почтовый адрес: 119334 г. Москва, ул. Вавилова 34/5

Тел. 8-499-1359763