

## ОТЗЫВ

Официального оппонента, академика РАН, д.х.н. Кочеткова Сергея Николаевича на диссертационную работу Владимирова Василия Игоревича «Роль кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторной системе», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Исследование молекулярных факторов, определяющих развитие и функционирование фоторецепторных клеток и нейронов, проведённое в диссертационной работе Владимирова В.И. является чрезвычайно актуальным, и затрагивает такие области науки как биохимия, молекулярная биология и генная инженерия. Учитывая высокую сложность организации и функционирования нервной ткани, а также недостаточную степень изученности патологических процессов, медикаментозное лечение широкого круга нейрофтальмологических и нейродегенеративных заболеваний, в настоящее время, существенно затруднено. Отсюда, выбранное автором направление - изучение молекулярных основ обеспечения кальций-чувствительности, локализации и активности белков-регуляторов функционирования фоторецепторной и нервной ткани является чрезвычайно актуальным.

В представленной работе, автор сфокусировался на роли мультифункционального белка кавеолин-1 в возможной регуляции им белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров (НКС), которые являются кальций-чувствительными модуляторами ключевых ферментов, вовлечённых в систему генерации и передачи нервного импульса в различных типах клеток. Несмотря на то, что центральным объектом, изучаемым в работе, являются белки преимущественно локализирующиеся в наружных сегментах фоторецепторных клеток - палочек, важно отметить, что полученные в работе данные, касательно регуляции активности белков НКС, можно использовать при изучении функционирования в норме и при патологиях, как фоторецепторных клеток, так и нейронов.

Диссертационная работа Владимирова В.И. построена по стандартной схеме и включает в себя шесть основных разделов:

В разделе «**обзор литературы**» приводится вся необходимая информация о функционировании каскада передачи зрительного сигнала, а также роли белков семейства НКС в регулировании этого процесса. Особая роль уделяется строению и описанию специфичности каждого НКС, изучаемого в работе, в отдельности. Важным пунктом раздела является описание строения и функциональной роли белков семейства кавеолинов. Автором приводится общая информация о функционально-важных участках

кавеолина-1 - сайт фосфорилирования Y14 и функциональный (scaffolding) домен. Кроме этого, особое внимание уделено влиянию окислительного стресса на кавеолин-1, и происходящие при этом изменения регуляторной функции белка.

Большой набор использованных в работе методик, описанных в разделе **«материалы и методы»**, говорит о высоком методологическом уровне проведённого исследования. При выполнении работы использовался широкий спектр биохимических и молекулярно-биологических методов, а также ряд высокотехнологичных инструментальных подходов. Кроме того, в работе проводились эксперименты с использованием клеточных и животных моделей. Кроме того, в работе использовались методы измерения функциональной активности белков с применением радиоактивных изотопов кальция и фосфора.

Раздел **«результаты и их обсуждение»** представляет собой развёрнутое описание полученных в работе данных, и может условно разделён на несколько частей. В первую очередь идёт описание методики получения и очистки рекомбинантных белков НКС и различных фрагментов кавеолина-1. Здесь особое внимание стоит уделить усовершенствованию методики очистки НКС. Разработанная методика основана на разности гидрофобности у белков несущих миристиновую кислоту с их немиристоилированными вариантами. Как было показано автором, с применением двух последовательных гидрофобных хроматографических очисткой возможно очищать НКС со степенью миристоилирования выше 90%, даже если посттрансляционное миристоилирование не превышает 10%. Описываемая методика была апробирована на четырёх белках НКС, что позволяет предположить, что и очистка миристоилированных форм остальных белков семейства возможно осуществлять по описанной схеме.

Не менее значимым является получение и физико-химическая характеристика фрагментов N-концевого домена кавеолина-1. Важно отметить, что структура и функции кавеолина-1 в настоящее время широко исследуются в научной среде, но использованные в данной работе конструкции ранее не использовались. Учитывая структурное соответствие полученных рекомбинантных фрагментов кавеолина-1 его нативной форме, то можно говорить, что был получен новый инструмент для исследования функциональной активности кавеолина-1.

Исследование взаимодействия между НКС и кавеолином-1 несомненно выполнено на высоком уровне, учитывая, что было использовано три различных подхода, широко применяемых для изучения белок-белковых взаимодействий. Важно, что кинетические константы взаимодействия между НКС и кавеолином-1, полученные методом изотермической калориметрии титрования соответствуют данным, полученным с

использованием спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса. По полученным результатам было высказано предположение касательно механизма такого взаимодействия, для чего использовались методы компьютерного моделирования, позволившего предположить ряд важных аминокислотных контактов, предположительно определяющих обнаруженное взаимодействие.

Значительной частью работы стало изучение поведения НКС рековерина при окислительном стрессе, и влияние окисления на взаимодействие между НКС и кавеолоном-1. Как показано, в диссертационной работе, НКС рековерин может образовывать устойчивые ковалентные димерные формы, в условиях окислительного стресса, что было показано *in vitro*, на животной линии, и дополнительно подтверждено с использованием линии эукариотических клеток. Как известно воздействие света высокой интенсивности приводит к ряду офтальмологических патологий, и, в частности, к гибели фоторецепторных клеток. Интересно, что рековерин в условиях интенсивного светового облучения окисляется, что может быть связано с участием такой формы белка в патогенезе соответствующих заболеваний. Особо стоит отметить, продемонстрированное в работе влияние моделирования условий окислительного стресса на взаимодействие НКС и кавеолина-1, которое принципиально изменяет кальций-чувствительность (в случае NCS1) и интенсивность взаимодействия НКС, по сравнению с не окисленными формами белков.

Подводя итоги работы, автор делает выводы касательно роли кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторной системе. В целом, выводы полностью соответствуют полученным результатам, хорошо структурированы, и позволяют утверждать, что проведённая работа вносит ощутимый вклад в понимание молекулярных механизмов функционирования белков НКС, и регулируемых ими процессов.

Несмотря на это работа не лишена **ряда недостатков**, а именно:

1. В работе продемонстрировано влияние кавеолина-1 на взаимодействия НКС со своими мишенями при избыточных концентрациях кальция (или его полного отсутствия), что не совсем соответствует физиологическим условиям. Отсюда, видится крайне интересным проведение ряда экспериментов в физиологическом диапазоне концентрации внутриклеточного кальция, с целью установления влияния кавеолина-1 на кальций-зависимую функциональную активность НКС.
2. Принимая во внимание эксперименты, проведённые для характеристики использованных в работе конструкций N-концевого фрагмента кавеолина-1, всё же

следует разработать способ для оценки функциональной активности препаратов кавеолина-1. Это вопрос актуален так же и по причине того, что использованный в работе фрагмент является по сути только половиной от нативного белка, что наверняка имеет значительные последствия на его фолдинг и функционирование.

3. Предложенная в работе модель взаимодействия между кавеолином-1 и рековерином так же вызывает несколько вопросов. Во-первых, отсутствие точно определённой структуры кавеолина-1, и использование вместо неё компьютерно-рассчитанной модели белка накладывает ряд ограничений на возможности молекулярного докинга и интерпретацию, полученных с его помощью результатов. Во-вторых, сильные ограничения размера фрагментов белков, участвующих в моделировании комплекса, что так же уменьшает ценность полученных результатов. И в-третьих, наряду с уже применённым подходом, рекомендуется использование метода молекулярной динамики для повышения достоверности получаемых результатов, а соответственно, и сделанных на их основе выводов о механизме исследуемого белок-белкового взаимодействия.

Тем не менее указанные недостатки ни в коей мере не умаляют высокой ценности проделанной работы, и полученных результатов.

### **Заключение**

В диссертационной работе Владимирова В.И. проведено полномасштабное исследование, которое демонстрирует высокий профессионализм и научную грамотность диссертанта. Широкий набор применённых в работе методологических подходов и анализ полученных результатов, не оставляют сомнений в квалификации автора.

Таким образом, диссертационная работа Владимирова В.И. «Роль кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторной системе» полностью соответствует требованиям предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук (в том числе пп. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, в редакции с изменениями, утверждёнными Постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016г. № 748, от 29.05.2017г. № 650). Автор диссертационной работы - Владимиров Василий Игоревич, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия.

**Официальный оппонент**

**Кочетков Сергей Николаевич,**

академик РАН, доктор химических наук,

профессор, зав. лабораторией молекулярных

основ действия физиологически активных соединений

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

E-mail: kochet@eimb.ru

Телефон (раб.): +7 495 938-16-89

Подпись академика, д.х.н. Кочеткова С.Н.

«Удостоверяю»

Учёный секретарь ИМБ РАН,

к.в.н. Бочаров Александр Анатольевич



17 сентября 2020 г.