

ОТЗЫВ

официального оппонента, д.х.н. Князева Александра Владимировича 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.

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Владимирова В.И. посвящена изучению молекулярных основ функционирования системы генерации и передачи зрительного сигнала в фоторецепторной клетке позвоночных животных. Как известно, поглощение кванта света молекулой белка родопсина запускает цепь белковых взаимодействий, в конечном итоге, приводящих к клеточной сигнализации. Этот процесс находится под регуляцией белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров (НКС), способных в ответ на изменение концентрации внутриклеточного кальция регулировать широкий спектр своих мишеней. НКС имеют сходное строение, имея в своём составе от двух до четырёх функционально-активных Ca^{2+} -связывающих домена типа EF-hand, ацилированный миристиновой кислотой N-концевой домен, и способность менять свою конформацию в ответ на взаимодействие с ионами металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}). Несмотря на схожее строение, каждый НКС имеет различный набор белков-мишеней, часть из которых, регулируется несколькими НКС, другие же являются высокоспецифичными к своим белковым партнёрам. Все эти особенности позволяют НКС регулировать функционирование нейронов в широком диапазоне кальциевых сигналов. Так регуляция НКС проявляется в процессах роста и выживаемости нейронов, рецепции и трансмиссии сигналов, и многом другом.

Особое место в процессах функционирования НКС занимает их способность взаимодействовать с фоторецепторными мембранами, которое является принципиальным для их активности, и совместной локализации со своими белковыми мишенями. Важнейшими мембранными участками, широко организующими сигнальную активность в организме, являются рафт-структуры, основная регуляторная активность которых проявляется благодаря мультифункциональному белку кавеолин-1, который был обнаружен в фоторецепторной системе, но его роль в ней ранее не исследовалась.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах, имеет 34 иллюстрации, и 170 литературных источников, и включает в себя разделы: «Обзор литературы»,

«Экспериментальная часть», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы».

В разделе «Обзор литературы» Владимировым В.И. изложены современные данные отражающее современное состояние науки по теме диссертации, приведены данные касательно функционирования зрительной системы, роли НКС в регуляции процессов передачи сигнала, а также особенностей функционирования белков семейства кавеолинов. На основании представленных литературных данных описаны современные проблемы изучения фоторецепторной системы, в особенности нюансы кальциевой чувствительности и регуляции функционально-важных мишеней, а так же предложены пути их решения, которые легли в основу проведённой работы.

Экспериментальная часть представлена набором методов, применённым для решения поставленных задач. Автором были применены разнообразные подходы, используемые в молекулярной биологии, биохимии и компьютерном моделировании, для изучения белок-белковых взаимодействий, что свидетельствует о высоком методологическом уровне проведённого исследования. Общий диапазон методов охватывает как манипуляции с рекомбинантными белками, так и эксперименты на моделях эукариотических клеток и животных линиях.

В разделе «Результаты и их обсуждение» приводится анализ полученных экспериментальных данных. В первую очередь следует описание идентификации белков НКС в составе фоторецепторных рафт-структур при различных кальциевых состояниях фоторецепторной сетчатки. Далее приводятся процедуры очистки и характеристики структур N-концевого фрагмента кавеолина-1 и белков семейства НКС - рековерина, GCAP1, GCAP2 и NCS1. Здесь, особый интерес вызывает разработанная в ходе выполнения диссертации методика разделения миристоилированной и немистоилированной форм рекомбинантных НКС, которая позволяет получать препараты НКС со степенью миристоилирования выше 95% в не зависимости от исходного миристоилирования. Наличие прямого взаимодействия между N-концевым доменом кавеолина-1 (и функциональным доменом) с белками НКС доказывается несколькими методами: метод преципитации на аффинном сорбенте, метод изотермической калориметрией титрования и методика ППР-спектроскопии, что свидетельствует о высокой степени достоверности полученных результатов. Кроме этого, в работе было показано влияние взаимодействия с кавеолином-1 на функциональные свойства НКС - регуляцию своих внутриклеточных мишеней, и кальций-чувствительность. Важная роль отводится экспериментам с окисленными формами НКС и кавеолина-1. Судя по выполненным экспериментам, окислительный стресс в

фоторецепторной системе оказывает существенное влияние на константу взаимодействия белков и Ca^{2+} -зависимость описываемого взаимодействия, что может иметь серьёзные последствия для функционирования НКС при патологических состояниях сетчатки. В конце раздела приведён анализ компьютерного моделирования трёхмерных моделей N-концевого фрагмента кавеолина-1 и рековерина, на основании которого был предложен механизм белок-белкового взаимодействия. Сделанные, по полученным результатам «Выводы» логически обоснованы, хорошо структурированы, и чётко соответствуют цели и задачам, поставленным в исследовании.

Замечания к диссертации

Целесообразно указать на некоторые недостатки и замечания, возникающие в ходе анализа представленной работы:

Так, в качестве имитации окисленной формы N-концевого фрагмента кавеолина-1 автором была проведена аминокислотная замена Y14E, что не в полной мере соответствует фосфорилированию кавеолина-1 по Y14. Как известно, фосфорилирование кавеолина-1 ключевой процесс, влияющий на его функциональную активность, и хотя замена на глутаминовую кислоту создаёт подобие отрицательного заряда, но она имеет отличное от тирозина химическое строение, что может оказывать значительный эффект в реализации белок-белкового взаимодействия. В частности, фосфорилирование кавеолина-1 по Y14 позволяет белку вступать в реакции, основанные на взаимодействии с SH_2 и SH_3 белковыми доменами, что, естественно не может происходить при замене Y14E.

В разделе 3.15. приведено взаимодействие различных форм N-концевого фрагмента кавеолина-1 с окисленными формами рековерина. Можно ли, основываясь на полученных данных, сделать общий вывод о влиянии окислительного стресса на взаимодействие НКС и кавеолина-1 и последствия такого взаимодействия?

Несмотря на то, что в работе показано, что окисление рековерина (*in vivo*) происходит одновременно с фосфорилированием кавеолина-1, не совсем понятно существует ли какая-либо связь между этими явлениями.

Заключение, теоретическая и практическая значимость работы

Диссертация Владимирова В.И. представляет собой комплексное исследование, затрагивающие одну из важнейших областей функционирования живых систем - клеточную сигнализацию, и тонкие механизмы её регулирования. Исследования факторов, определяющих чувствительность регуляторных белков к кальциевым сигналам в норме и патологических состояниях являются чрезвычайно актуальными для современной науки. В представленной диссертации показано, что одним из таких факторов является кавеолин-1 - мультифункциональный белок, который организует сигнальную активность в

фоторецепторной системе. Оказываемый эффект может достигаться, как путём прямого взаимодействия с белками НКС, так и благодаря компарментализации НКС со своими мишенями в фоторецепторных мембранах. Учитывая высокую специфичность НКС для нервной ткани, изучение механизмов их регуляции позволяет лучше понять особенности, лежащие в основе патогенеза целого ряда офтальмологических заболеваний (диабетическая ретинопатия, синдром сухого глаза, и т.д.), и заболеваний центральной нервной системы, таких как: болезнь Альцгеймера, шизофрения, болезнь Паркинсона и др. Полученные Владимиром В.И. результаты могут служить основой для дальнейших исследований, направленных на создание новых терапевтических подходов и лекарственных препаратов.

Таким образом, диссертационная работа Владимира 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, (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 - Владимир Василий Игоревич, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия.

Официальный оппонент

Князев Александр Владимирович

доктор химических наук, профессор
главный научный сотрудник
декан химического факультета

Федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

603950, г.Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

E-mail: knyazevav@chem.nngu.ru

Телефон (раб.): +7 (831) 462 30 34

Подпись д.х.н. Князева А.В.

«Удостоверяю»

Учёный секретарь ИИУ

к.соц.н. Черноморская Тариса Юрьевна

17 сентября 2020г.

