

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу **Спировой Екатерины Николаевны** «Анализ мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов сочетанием кальциевого имиджинга и электрофизиологии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Объект диссертационного исследования. В организме человека никотиновые ацетилхолиновые рецепторы широко представлены нервной системе, где локализуются в нервных и нервно-мышечных синапсах, а также и в других органах и тканях, например, в клетках иммунной системы. Нарушения в функционировании различных подтипов никотиновых рецепторов приводят к развитию миастений, нейродегенеративных и психических заболеваний и др.

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы вместе с серотониновыми, глициновыми рецепторами и рецепторами γ -аминомасляной кислоты входят в число представителей семейства Cys-петельных рецепторов группы лиганд-управляемых ионных каналов. Лиганды никотиновых рецепторов очень разнообразная группа соединений, в их число входят природные и химически синтезированные вещества: низкомолекулярные соединения, пептиды или белки. В настоящее время научным сообществом ведется интенсивное изучение различных лигандов никотиновых рецепторов. Наиболее интересными являются лиганды, характеризующиеся высокой специфичностью действия на никотиновые рецепторы, т.к. структуры этих соединений могут лечь в основу медикаментов, назначаемых пациентам для лечения заболеваний, связанных с дисфункцией никотиновых рецепторов. В связи с большим разнообразием самих никотиновых рецепторов, а также их сходством с другими представителями цис-петельных рецепторов, идентификация высокоспецифичных лигандов является довольно непростой задачей.

Структура диссертационной работы. Диссертационная работа Спировой Е.Н. построена по классической схеме и включает такие разделы, как введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Представленная диссертация изложена на 118 страницах, содержит богатый иллюстративный материал (40 рисунков и 11 таблиц), который облегчает восприятие текста. Число используемых в тексте диссертации литературных источников равно 293. Во введении Спирова Е.Н. описывает актуальность, научную новизну и практическую значимость диссертационной работы. После введения диссертант определяет цель и задачи своего исследования.

В работе представлен подробный литературный обзор, в полной мере раскрывающий современные знания о подтипах никотиновых рецепторов и их лигандах. Обзор литературы содержит исчерпывающие сведения о субъединичном составе и пространственных структурах рецепторов ацетилхолина. Мне представляется, что обзор литературы заслуживает публикации в научном журнале в виде обзорной статьи. Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание используемых диссертантом молекулярно-биологических и биоинформатических методов, сайт-направленного мутагенеза, электрофизиологии, цитохимии и кальциевого имиджинга. Также в этом разделе представлено, как был проведен статистический анализ полученных экспериментальных данных. В следующем разделе («Результаты и обсуждение») диссертант шаг за шагом, согласно поставленным ранее задачам, формулирует полученные и проанализированные результаты диссертационной работы. Хочется отметить, что раздел «Результаты и обсуждение» хорошо иллюстрирован, содержит много фотографий, графиков, гистограмм и таблиц. Подписи ко всем рисункам весьма информативны. Спирина Е.Н. суммирует все полученные результаты в заключении и далее формулирует выводы своего диссертационного исследования. Представленные выводы полностью соответствуют поставленным задачам. Автореферат Спириной Е.Н. представляет лаконичное изложение основных положений ее диссертационной работы, он содержит много иллюстративного материала. При чтении автореферата формируется достаточно полное представление о проделанной работе и полученных выводах.

Основные результаты диссертационного исследования. Все полученные результаты, представленные в диссертационной работе Спириной Е.Н., можно поделить на три большие части. Первая из них посвящена разработке метода кальциевого имиджинга с использованием одноволнового генетически-кодируемого сенсора Case12 для тестирования фармакологических характеристик мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и нейронального $\alpha 7$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Также доказана применимость разработанного метода для исследования специфичности мутантных форм рецептора на примере мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ никотинового рецептора, у которого субъединица $\alpha 1$ содержит точечные аминокислотные замены, которые детектируются у больных миастенией различного типа. Раздел важен для понимания молекулярных механизмов развития этого заболевания, а в перспективе полученные результаты и разработанные подходы откроют дорогу к созданию способов его лечения.

Во второй части работы исследуется вопрос о различиях в аминокислотных последовательностях ортостерических лиганд-связывающих сайтов $\alpha 7$ и $\alpha 9$ субъединиц,

которые являются одной из возможных причин неспособности $\alpha 9$ -содержащих никотиновых рецепторов активироваться под действием эпибатицина. При помощи кальциевого имиджинга с Case12 выявлено аминокислотное положение в экстрацеллюлярном домене $\alpha 7$ субъединицы нейронального никотинового ацетилхолинового рецептора (119), аминокислотная замена в котором на соответствующий остаток $\alpha 9$ субъединицы приводит к значительному снижению аффинности мутантных рецепторов к ацетилхолину и особенно к эпибатицину по сравнению с рецептором дикого типа.

И, наконец, в третьей части диссертационного исследования Спирова Е.Н. изучает различные природные и синтетические низкомолекулярные и пептидно-белковые соединения в качестве потенциальных лигандов никотиновых рецепторов некоторых подтипов. Среди этих соединений выявлены агонисты $\alpha 7$ никотинового ацетилхолинового рецептора (химически синтезированные производные хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин), антагонисты $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ никотиновых рецепторов (природные структурные аналоги *d*-тубокурарина и компонент яда гадюки *B. arietans*, баптид 2) и антагонисты $\alpha 9\alpha 10$ никотинового рецептора (аналоги *d*-тубокурарина и панкреатическая фосфолипаза A_2). Особое внимание уделено изучению механизма действия перечисленных лигандов на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы.

Актуальность, новизна и практическая значимость диссертационного исследования.

Разработанный метод кальциевого имиджинга с Case12, представленный в диссертационной работе, имеет некоторые преимущества над такими методами изучения нейронального $\alpha 7$ и мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов как радиолигандный анализ, электрофизиология (метод двухэлектродной фиксации потенциала), и кальциевый имиджинг с использованием других видов сенсоров. Нейрональный $\alpha 7$ никотиновый ацетилхолиновый рецептор характеризуется очень быстрой десенситизацией, что в различных методиках затрудняет регистрирование ответов, опосредованных активацией данного подтипа никотиновых рецепторов. В представленном методе кальциевого имиджинга использование позитивного аллостерического модулятора PNU120596 решает проблему быстрой десенситизации $\alpha 7$. Разработанный метод может быть применен как для исследования мутантных рецепторов, так и для скрининга потенциальных лигандов с последующим изучением механизма их действия.

Наряду с идентификацией эффективных лигандов, раскрытие механизмов действия этих соединений на рецепторы имеет большое значение дизайна новых лекарственных

препаратов. Спирова Е.Н. в своем диссертационном исследовании показывает не только способность новых антагонистов связываться с никотиновыми рецепторами и ингибировать агонист-индуцированные ответы, но также говорит о механизмах этого ингибирования.

Степень обоснованности научных положений и выводов. Представленные Спировой Е.Н. результаты были получены при помощи современных научных методов с вовлечением профессионального оборудования. Были проведены необходимые контрольные эксперименты, верно выполнен статистический анализ. Стоит отметить, что все изложенные результаты были опубликованы в 6 высокорейтинговых зарубежных журналах, где в ходе рецензирования большое внимание уделяется достоверности экспериментальных данных. Сформулированные выводы полностью соответствуют полученным результатам. Основные положения и выводы диссертационной работы Спировой Е.Н. научно обоснованы и аргументированы.

Вопросы и замечания официального оппонента к диссертационной работе.

Как и всякая интересная и большая работа, диссертационная работа Спировой Е.Н. имеет некоторое небольшое количество недостатков, выявить которые достаточно сложно.

1. Основной результат работы - это создание удобной в использовании и подходящей для высокопроизводительного скрининга системы мониторинга активности nAHR с помощью коэкспрессии генов кальциевого сенсора Case12 и соответствующих рецепторов в клетках млекопитающих, в данном случае, Neuro2a. Мне представляется, что разработанная система могла бы быть значительно улучшена и получила бы более широкое применение, если бы временная котрансфекция была бы заменена на создание стабильной клеточной репортерной линии. Сейчас есть много возможностей для подобного эксперимента, например, с использованием лентивирусных векторов или векторов на основе транспозазы. После отбора клонов, экспрессирующих все необходимые гены, например, с помощью клеточного сортера, можно было бы не заботиться о выходе трансфекции, а также о том, что клетки будут экспрессировать только часть целевых генов. Так, например, на рисунке 19 панель Ж, показано соотношение клеточных популяций после котрансфекции. Только 6.6% клеток содержали оба целевых белка. При этом даже у целевой популяции уровень экспрессии этих белков был разным. При этом довольно много клеток синтезировали белок сенсор, но не окрашивались бунгаротоксином, и, следовательно, были лишены рецептора. Такие клетки непродуктивно повышают фон в измерении флуоресценции в смеси. Насколько

лучше было бы один раз получить моноклональную культуру клеток, имеющую все компоненты и более не возвращаться к экспериментам по котрансфекции!

2. При проверке работы системы кальциевого имиджинга было проведено сравнение уровня флюоресценции Case12 в клетках, коэкспрессирующих Case12 и $\alpha 7$ nAHP (рисунок 21) в зависимости от концентрации ацетилхолина. Хорошим контролем, который, к сожалению, не был приведен на картинке было бы использование клеток, трансфецированных плазмидой, кодирующей Case12, но не $\alpha 7$ nAHP. Теоретически можно допустить, что АЦХ может изменять концентрацию кальция в клетках независимо от гетерологически экспрессируемого гена рецептора. Для стороннего читателя не очевидно, что в клетках Neuro2a нет каких-либо эндогенных рецепторов. Такой контроль необходимо было бы включать и в случае тестирования потенциальных агонистов nAHP. Теоретически возможно, что новые соединения могут влиять на уровень кальция в клетках каким-либо способом, независимым от тестируемого рецептора.
3. На странице 61 приведена ссылка на рисунок, расположенный в 6 страницах впереди. Это не очень удобно, хотя и не критично.
4. Еще одно предложение, не очень важное, заключается в том, что термин «экстрацеллюлярный» можно было бы заменить на внеклеточный, но это, разумеется, совсем не необходимо.
5. При исследовании с помощью сайт-направленного мутагенеза $\alpha 7$ nAHP с целью тестирования функциональной значимости различий с $\alpha 9$ nAHP, была поставлена цель поиска аминокислотных остатков, определяющих специфичность действия никотина и эпибатина, являющихся агонистами $\alpha 7$ рецептора и антагонистами $\alpha 9$ рецептора. Самая интересная мутантная форма, L119D, проявляет значительно большее ослабление действия эпибатина по сравнению с ацетилхолином. Тем не менее обращения действия не происходит. Возможно, следовало бы обсудить, почему это так. Возможно, важен весь «ансамбль» аминокислот ортостерического лиганд-связывающего участка.
6. При тестировании ингибирующего действия панкреатической ФЛА₂ на $\alpha 9\alpha 10$ nAHP было бы интересно проверить, важна ли ферментативная активность этого белка для ингибирования?

Все указанные недостатки, безусловно носят технический характер и никоим образом не снижают общее прекрасное впечатление от этой выдающейся работы.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней". Диссертационная работа Спировой Е.Н. является

логически выстроенным и завершенным исследованием. В ходе работы использованы современные методы, получены очень интересные результаты, которые нашли свое отражение в выводах. Следует отдельно отметить, что результаты работы опубликованы в шести международных публикациях в высокорейтинговых престижных международных журналах.

Диссертация Спировой Екатерины Николаевны «Анализ мышечных и нейрональных никотиновых рецепторов сочетанием кальциевого имиджинга и электрофизиологии» соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650). Из всего этого следует, что Спирова Е.Н. в полной мере заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Профессор химического факультета,
директор Института функциональной геномики
МГУ имени М.В. Ломоносова,
д.х.н.

Сергиев Петр Владимирович

119991, Москва, Ленинские горы, дом 1
Тел. (495) 939-54-18. E-mail: petya@belozersky.msu.ru

