

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Логашинной Юлии Александровны «Пептиды морских анемонов, модулирующие активность TRPA1 рецепторов», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10-Биоорганическая химия.

Яды животных являются источниками пептидов, модулирующих активность ионных каналов цитоплазматической мембраны клетки. Диссертация Логашинной Ю.А. посвящена исследованию пептидов из ядов актиний северных морей *M. senile* и *U. eques*. Работа заключалась в идентификации биологически-активных пептидов, их выделении, молекулярном клонировании кДНК, кодирующих белки-предшественники пептидов, определении пространственной структуры, а также функциональных исследованиях активности пептидов по отношению к нативному каналу TRPA1 и его рекомбинантному аналогу в системах *in vivo* и *in vitro*. Актуальность темы исследования определяется тем, что пептиды, выделенные из ядов животных, служат уникальным природным инструментом для исследования механизмов работы ионных каналов. Объект исследования диссертации - канал TRPA1 является неселективным катионным каналом с исключительно интересными свойствами. Он обладает хемочувствительностью, термочувствительностью, механочувствительностью, круг агонистов этого канала необыкновенно обширен, поэтому его называют полимодальным каналом-интегратором стимулов химической и физической природы. Исследования, проведенные диссертантом, имеют выраженную медицинскую направленность, поскольку этот канал вовлечен в патофизиологические процессы, связанные с генерацией боли, прежде всего, хронической боли, сопутствующей нейропатии и воспалению. В этом состоит научно-практическое значение диссертации: разработка инструментов для управления свойствами TRPA1 является основой для изучения механизмов работы канала, понимание которых создает теоретическую базу для разработки новых фармакологических подходов управления болью. Исследование обладает несомненной новизной. В настоящее время из ядов животных выделено только два пептида, обладающих ингибирующим действием на TRPA1. Это пептид из яда тарантула и пептид из яда бразильского странствующего паука, но оба они лишены селективности, поскольку их мишенями также являются потенциал-управляемые натриевый и кальциевый каналы, соответственно. Научная новизна исследования Ю.А. Логашинной заключается в том, что из яда актиний ей впервые удалось выделить два пептида, которые сами по себе не активируют TRPA1, но являются позитивными модуляторами его активности. Предварительный скрининг, выполненный в диссертации на ряде других каналов, дает

основание полагать, что эти пептиды обладают селективностью по отношению к TRPA1 и, следовательно, есть перспективы их применения для разработки нового класса фармакологических препаратов. Теоретическое значение результатов состоит в том, что автору удалось получить новый инструмент для исследования механизмов работы TRPA1 канала.

Диссертация Ю.А. Логашинной изложена на 149 страницах, содержит 38 рисунков и 4 таблицы и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы.

Глава «Обзор литературы» состоит из трех частей. Первая часть содержит описание современных представлений о механизмах восприятия боли. Во второй части автор дает общую характеристику семейству TRP-каналов. Третья часть посвящена объекту исследования диссертации – каналу TRPA1. Здесь автор приводит имеющиеся на сегодняшний день в литературе данные о структуре TRPA1, его локализации, физиологических функциях, включая хемочувствительность, термочувствительность и механочувствительность этого канального белка. Подробно рассмотрены механизмы активации TRPA1 при взаимодействии с многочисленными лигандами, приведены данные относительно патофизиологических процессов, протекающих при участии TRPA1, а также информация об использовании TRPA1 в качестве терапевтической мишени при создании анальгетических и противовоспалительных препаратов.

В главе «Материалы и методы» дается описание используемых в работе подходов и протоколов. Методический уровень работы очень высок.

В разделе «Результаты и обсуждение» автором представлены результаты собственных экспериментов. Новизна полученных в диссертации результатов заключается в следующем:

1. Из яда актиний северных морей *M. senile* и *U. eques* выделены два новых пептида, названные Ms 9a-1 и Ueq 12-1.
2. Для обоих пептидов определены нуклеотидные последовательности, кодирующие белки-предшественники. Для этого были клонированы кДНК предшественников с использованием метода быстрой амплификации 3'- и 5'-концов кДНК.
3. Впервые определена уникальная пространственная структура молекулы Ueq 12-1. Этот пептид стал первым представителем нового класса токсинов морских анемонов.
4. С использованием бактериальной системы экспрессии получены рекомбинантные аналоги пептидов.
5. Биологическая активность пептидов протестирована на рекомбинантных TRPA1 крысы, гетерологически экспрессированных в клетках линии CHO и в ооцитах *Xenopus laevis*, а также на нативных TRPA1 в культивированных DRG нейронах крысы. Показано, что пептиды не

являются агонистами TRPA1. В присутствии пептидов увеличивается ионный ток, индуцируемый агонистами в TRPA1-положительных клетках. Таким образом, выделенные пептиды являются первыми обнаруженными положительными модуляторами активности TRPA1.

6. Впервые обнаружена антибактериальная активность пептида Ueq 12-1 против грамположительных бактерий.

7. Биологические эффекты пептидов изучены на мышах. Впервые обнаружены анальгетические и противовоспалительные свойства пептидов в системе *in vivo*.

Хочется отметить, что в работе собран исключительно обширный экспериментальный материал, полученные данные обладают абсолютной новизной.

Раздел «Заключение» представляет собой краткое обобщение результатов исследования. Научные положения и выводы диссертационной работы логично вытекают из полученных экспериментальных данных и являются обоснованными. Достоверность полученных результатов обусловлена использованием современных методов биоорганической химии, молекулярного клонирования, биофизики клетки, включая электрофизиологические исследования и микрофотометрию с флуоресцентными Ca²⁺-зондами (Ca²⁺-imaging), а также использовались модели боли и воспаления у мышей и оценка поведенческих реакций. Сильной стороной диссертации является применение комплексного мультидисциплинарного подхода для достижения поставленных целей исследования. Ключевые результаты опубликованы в трех статьях в журналах из списка ВАК и 13 тезисах российских и международных конференций, имеется заявка на патент. Публикации и автореферат полностью отражают результаты диссертации.

Вопросы и замечания.

1. В обзоре литературы п.2.3., стр. 12 и 13 название семейства TRP-каналов «Transient Receptor Potential channels» ошибочно переведено на русский как «рецепторы временного потенциала». «Receptor potential» следует переводить с английского как «рецепторный потенциал». Название семейства TRP-каналов имеет исторический контекст. Если вспомнить историю открытия первого представителя семейства, то речь идет о суммарном рецепторном потенциале фоторецепторных клеток дрозофилы.

2. После ознакомления с диссертацией у меня сложилось впечатление, что неправильный перевод не случаен. TRPA1 в диссертации считается рецептором, термин канал применительно к нему не употребляется вовсе. На мой взгляд, такая трактовка ошибочна. По определению, рецептор цитоплазматической мембраны – это белковая молекула, которая обеспечивает детекцию внешнего экстраклеточного стимула и его последующее преобразование во внутриклеточный сигнал. В обзоре литературы подробно описываются механизмы

взаимодействия TRPA1 с многочисленными агонистами, и из этого описания следует, что для одних из них TRPA1 является лиганд-активируемым каналом, для других – рецептор-активируемым каналом, для третьих – молекулярным сенсором. Вопрос: для каких конкретно агонистов, упомянутых в диссертации, TRPA1 выполняет функцию ионотропного рецептора?

3. Сложность исследования TRPA1 состоит в том, что, несмотря на высокую степень консервативности, канал обладает видоспецифичностью функциональных свойств. Этот феномен убедительно описан в обзоре литературы. Учитывая видоспецифичность активности TRPA1, возникает вопрос, почему в диссертации для исследования биологических эффектов пептидов была поставлена задача «клонирования гена TRPA1 крысы», активность пептидов *in vitro* тестировалась на TRPA1 крысы, а эксперименты *in vivo* были поставлены на мыши? Хотя первичные последовательности TRPA1 крысы и мыши имеют высокую степень идентичности, в отличие от крысы, у мыши есть две различные изоформы TRPA1. Кроме того, как отмечено в обзоре литературы (стр.47), замена единичного нуклеотида в кодирующей последовательности уже может привести к драматическому изменению свойств канала. Результаты экспериментов на TRPA1 крысы дают основание полагать, что пептиды должны усиливать боль, а эксперименты на мышах выявили анальгетические эффекты пептидов. Не может ли несоответствие результатов, полученных автором *in vivo* и *in vitro*, быть следствием того, что активность пептидов изучалась на разных TRPA1 – мышинном и крысином каналах, соответственно?

4. На рис. 19, стр. 68 показана «схема сборки ДНК конструкта для экспрессии рекомбинантных аналогов пептидов». Направление и положение олигонуклеотидных праймеров обозначены на схеме неправильно, при таком положении ПЦР реакция не пойдет.

5. На стр. 68 описано клонирование синтетических генов, кодирующих целевые полипептиды Ms 9a-1 и Ueq 12-1, в экспрессионный вектор pET-32b (+) по сайту EcoRV по тупым концам. При предложенном способе клонирования произойдет смещение открытой рамки считывания, кодирующей гибридный белок Trx-пептид, для ее сохранения необходимо было ввести в последовательность клонируемого гена дополнительный нуклеотид перед ATG-кодоном. Получились или нет в итоге рекомбинантные пептиды, слитые с тиоредоксином, нет возможности убедиться, поскольку отсутствуют белковые форезы, которые могли бы подтвердить экспрессию слитых белков соответствующего молекулярного веса в *E. coli*, степень их очистки и уменьшение размера после обработки бромцианом.

6. На основании того, что в присутствии Ms 9a-1 наблюдается некоторое увеличение тока/ Ca^{2+} сигнала, индуцированного агонистами в TRPA1-положительных клетках, автор приходит к заключению, что пептид потенцирует TRPA1. Между тем увеличение интегрального тока не эквивалентно потенциации канала. Величина интегрального тока определяется числом

активных каналов и их динамикой. Поэтому увеличение ответа клетки (электрофизиологического или кальциевого) в присутствии пептида могло происходить (1) за счет изменения аффинности канального белка к стимулирующему агонисту, (2) за счет увеличения скорости агонист-зависимого перехода TRPA1 в активное состояние и/или уменьшения скорости агонист-зависимой инактивации этого канала, а также (3) за счет увеличения вероятности открытого состояния. Увеличение аффинности и замедление инактивации не являются как таковые потенциацией канала. Анализ кинетических характеристик агонист-индуцированных ответов TRPA1-положительных клеток позволил бы отчасти оценить вклад некоторых механизмов, например замедления инактивации. Такой анализ не был проведен. Между тем, запись тока на Рис.6Г (автореферат) свидетельствует о том, что замедление инактивации вполне вероятно. Так, ответ на 100 мкМ АТС имеет признаки инактивации, а добавление Ms 9a-1 ее устраняет.

В тексте и подписях к рисункам (номера по автореферату) имеются неточности, например:

Рис. 5А. «Запись диклофенак-индуцированных ионных токов на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих *rTRPA1*, в отсутствие и в присутствии 300 мкМ Ms 9a-1 при линейном изменении потенциала от -80 мВ до +80 мВ». На Рис.5А показаны токи при двух фиксированных потенциалах 80 мВ и -80 мВ.

На Рис.5Б дозо-зависимость диклофенак-индуцированных токов аппроксимируется аналитически, причем без указания соответствующего уравнения. То же на Рис.6Б. Аналитическая кривая названа логистической, что неуместно, поскольку логистическая функция (кривая) – это S-образная кривая, являющаяся решением дифференциального уравнения Ферхюльста. Эта функция времени не имеет отношения к задачам сорбции. Стационарные концентрационные зависимости в простейшем случае аппроксимируются с использованием уравнения Хилла.

Регистрировавшийся ток назван в диссертации «исходящим». Международно-принятый термин outward current имеет давно устоявшийся русский эквивалент – это «выходящий ток».

Рис 6.А, «Запись диклофенак-индуцированных ионных токов на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих *rTRPA1*, в отсутствие и в присутствии Ms 9a-1 при ступенчатом изменении потенциала от -20 мВ до +80 мВ». Представлена запись тока, индуцированного диклофенаком при каком-то (не указано) фиксированном потенциале.

Высказанные замечания не снижают высокой научной значимости полученных в диссертации результатов и не влияют на общую положительную оценку работы, автором получены приоритетные данные по актуальной проблеме.

По масштабу поставленных задач, спектру используемых методов, научной новизне, актуальности, а также теоретической и практической значимости полученных данных диссертация Логашиной Юлии Александровны «Пептиды морских анемон, модулирующие активность TRPA1 рецепторов» соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04. 2016 г. № 335; 02.08.16 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650), а ее автор Логашина Юлия Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10- биоорганическая химия.

Ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной физиологии клетки ФБГУН
Института биофизики клетки РАН

доктор биологических наук

Марина Федоровна Быстрова

27 апреля 2018 года

Контактная информация:

142290, Пущино, ул. Институтская, д. 3

Тел.: (4967) 739308, e-mail: admin@icb.psn.ru

Подпись д.б.н. Марины Федоровны Быстровой удостоверяю

Зам. директора ИБК РАН



/к.б.н. Масулис И.С./