

“УТВЕРЖДАЮ”

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт биохимии им. А.Н.Баха
Российской академии наук

119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр.2
Тел.. 954-52-83, факс: 954-27-32

10.02.2015 № 12304-2171-101
на № 15/105-03 от 19.01.2015

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биохимии им. А.Н. Баха
Российской академии наук,
член-корреспондент РАН



В.О. Попов

«10» февраля 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук –
на диссертационную работу Кудряшовой Ксении Сергеевны
«РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ПОИСКА БЛОКАТОРОВ
ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА KV1»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.02 – Биофизика

Диссертационная работа Кудряшовой К.С. посвящена разработке и характеристике
клеточной системы для выявления блокаторов потенциал-чувствительных калиевых
каналов семейства Kv1.

Актуальность темы исследования.

Потенциал-чувствительные калиевые каналы (ПЧКК) – трансмембранные белки,
осуществляющие селективный транспорт ионов калия через клеточную мембрану.
Эффективная работа системы калиевых каналов необходима для функционирования как
возбудимых клеток (контроль потенциала действия), так и невозбудимых клеток
(поддержание потенциала покоя). Мутации и дисфункции ПЧКК являются причиной ряда
патологических процессов, а селективное блокирование ПЧКК обеспечивает действие
различных животных ядов. В связи с этим детальное изучение механизмов действия

ПЧКК и регуляции их активности различными соединениями имеет важное значение для понимания физиологических процессов в организме, их клеточных и молекулярных основ.

Традиционными средствами изучения работы ПЧКК являются метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp), радиоизотопные методы, а также регистрация перемещения через каналы рубидия и таллия. Однако все эти методы достаточно трудоемки и характеризуют только конечный результат блокирования канала – ионный транспорт, не предоставляя информации об исходных процессах связывания ПЧКК с блокаторами. В исследованиях последних лет показана эффективность альтернативных методических решений, основанных на регистрации связывания с ПЧКК флуоресцентно меченных лигандов, однако имеющиеся разработки разрозненны и не предоставляют ученым эффективного универсального инструментария, не требующего сложной и длительной модификации при переходе от одной системы к другой. Очевидно, что первоочередной интерес представляет функционирование ПЧКК животных клеток, тогда как для наработки существенных количеств ПЧКК оптимально использование бактериальных продуцентов. Выделение рекомбинантных белков и их последующее встраивание в природные или искусственные мембраны также значительно усложняет получение системы для исследования ПЧКК с воспроизводимыми свойствами.

В диссертационной работе К.С. Кудряшовой предложено оригинальное методическое решение, максимально использующее собственные процессы в клетках-продуцентах для получения системы с экспонированными и доступными для внешнего воздействия рекомбинантными ПЧКК. Сферопласты, полученные на основе бактериальных продуцентов рекомбинантных белков, экспонируют значительное количество ПЧКК, сохраняющих функциональную активность. Связывание ПЧКК в составе клеток с флуоресцентными метками предложено регистрировать в микрокуветах после разделения реакционной смеси центрифугированием. Данная система позволяет количественно оценить флуоресценцию каждой клетки и охарактеризовать процессы конкурентного связывания блокаторов с ПЧКК.

Представленное в диссертационной работе комплексное исследование подтверждает эффективность данного инструментария. С использованием предложенной клеточной системы проведена детальная характеристика процессов связывания ПЧКК с блокаторами и получен значительный массив новой научной информации о биологическом действии различных ядов животного происхождения.

Не вызывает сомнения актуальность проведенного исследования и его востребованность для развития современных исследований в области клеточной биологии

и биофизики.

Структура и содержание диссертации.

Работа изложена на 142 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, выводов и списка литературы (210 ссылок). Работа содержит 38 рисунков и 8 таблиц.

Литературный обзор (глава 1) полностью отражает проблематику диссертационной работы. Подробно рассмотрены особенности строения ПЧКК, механизмы их функционирования, активации и инактивации, разнообразие каналов семейства Kv1, их участие в различных физиологических процессах, ассоциированные заболевания и дисфункции, блокаторы ПЧКК, в том числе их представленность в ядах животных различных систематических групп. Диссертант рассматривает методические основы, возможности и ограничения различных подходов, используемых для выявления и характеристики новых блокаторов ПЧКК. Анализ литературы проведен на высоком профессиональном уровне и дает адекватное представление о современном состоянии дел по проблематике работы. Материал хорошо структурирован и четко изложен; рассмотрен весь ряд вопросов, которые впоследствии возникают при обсуждении полученных результатов. Рассмотрено значительное число публикаций, включая результаты исследований последних лет. Представленные сведения позволяют содержательно интерпретировать получаемые автором данные. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации автора, хорошем знакомстве с современным уровнем исследований по тематике выполненной работы.

Представленные в литературном обзоре сведения крайне важны для содержательной интерпретации получаемых автором данных и оценки их значимости.

Глава 2 диссертации («Материалы и методы») содержит изложение материалов, методик и расчетов, использованных при выполнении исследований. Рассмотрено приготовление сферопластов, экспериментальное изучение взаимодействия лигандов с ПЧСКК, методы обработки данных флуоресцентной микроскопии и расчета констант связывания для соединений, взаимодействующих с ПЧКК. Реализуемые в работе методы полностью адекватны решаемым задачам, позволяя получать наиболее корректные и содержательные результаты. Детальное изложение всех этапов проведения экспериментов обеспечивает однозначность интерпретации результатов исследования, описанных в последующих разделах диссертационной работы. Не вызывает сомнения приобретение К.С. Кудряшовой при выполнении диссертационной работы хорошей квалификации в области биофизики.

Глава 3 («Результаты и обсуждение») посвящена изложению экспериментов, проведенных диссертантом с использованием предложенной им клеточной системы и посвященных характеристике реакций лигандов разных классов с гибридными белками KcsA-Kv1.x на поверхности мембраны сферопластов. Убедительно показана корректность использования данной модели для изучения свойств лигандов и возможность их детальной, высокопроизводительной характеристики.

Новизна исследования и полученных результатов.

Диссертантом при изучении лигандов, связывающихся с ПЧКК, с использованием оригинальной клеточной системы получен большой массив новых научных данных. Наиболее значимыми представляются следующие результаты исследования:

- Разработана оригинальная методики измерения констант комплексообразования ПЧКК с их лигандами.
- Показана эффективность предложенной клеточной системы для поиска высокоаффинных пептидных лигандов ПЧКК в ядах животных.
- Охарактеризованы структурные особенности взаимодействующих с ПЧКК пептидных лигандов и их вклад в аффинность и специфичность комплексообразования.
- Показана высокая степень соответствия количественных характеристик реакции ПЧКК-лиганд, измеряемых с использованием предложенного подхода и традиционных методик.
- В результате проведенного скрининга выявлен ряд новых животных ядов, биологическое действие которых обусловлено связыванием с ПЧКК.

Корректность выводов и рекомендаций.

Диссертационная работа Кудряшовой К.С. представляет собой цельное завершённое исследование, выполненное на высоком научном и экспериментальном уровне. Работу отличает логичность и высокий методический уровень. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Использованный при обработке экспериментальных данных математический аппарат обеспечивает достоверность и высокую точность получаемых количественных характеристик межмолекулярных взаимодействий. Описываемые эффекты подтверждены корректно планированными контрольными экспериментами. Выводы обоснованы, соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Результаты работы широко представлены научному сообществу на семи российских и международных конференциях; основные положения и выводы диссертации опубликованы в трех статьях в международных и отечественных журналах. В виде публикаций и докладов представлены все основные результаты диссертации. Содержание

автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Предлагаемая методика анализа микроскопических данных о связывании флуоресцентной метки предусматривает определение средней по площади клетки интенсивности флуоресценции. Учитывая, что в ряде экспериментов за счет добавления соединения, конкурентно связывающегося с каналом, происходило почти полное ингибирование связывания, не исключено, что в таких опытах часть клеток просто не идентифицируется по флуоресцентным данным. Потенциально возможен альтернативный, существенно менее трудоемкий подход, когда измеряется просто средняя флуоресценция на единицу площади изображения (учитывая, что в сравниваемых препаратах концентрация клеток одинакова.) Рассматривалась ли в диссертации возможность таких расчетов? На чем основан выбор использованного в работе варианта?
2. Не совсем удачна формулировка о выявлении блокаторов каналов на основании экспериментов по конкурентному связыванию с флуоресцентными зондами, поскольку соединение-конкурент потенциально может, связываясь с поверхностной белковой частью канала, оставлять открытым доступ для проникновения внутрь канала калиевых ионов. Следует оговорить, что при характеристике новых биологически активных соединений предлагаемых скрининг должен сопровождаться последующим тестированием собственно проницаемости тех или иных мембранных систем для ионов калия.
3. Для оценки возможностей сферопластов как тестовой культуры при характеристике соединений, связывающихся с поверхностными белками *E. coli*, представляет интерес стабильность свойств таких препаратов. На протяжении какого временного интервала после обработки и при каких условиях хранения возможно получение воспроизводимых результатов? Достаточно ли обеспечение эквивалентной концентрации клеток в препарате, чтобы сопоставлять данные из разных серий экспериментов?
4. Из таблицы 4 диссертации (стр. 96), суммирующей результаты измерения констант связывания лигандов с ионными каналами предложенным методом и известными ранее подходами (patch-clamp), следует хорошая степень соответствия результатов. Однако в некоторых случаях величины для сравниваемых методов отличаются на порядок. В чем могут состоять причины таких отличий?

Вышеизложенные соображения не снижают общую положительную оценку работы.

Значимость полученных результатов для науки и производства.

Диссертантом предложен эффективный инструментарий для научных исследований, позволяющий с высокой точностью и производительностью осуществлять количественную характеристику процессов биоспецифических взаимодействий на поверхности клеточных мембран, в том числе для рекомбинантных трансмембранных белков, встраивающихся в клеточную мембрану бактерии и характеризующихся после получения сферобласта. Разработанные методы анализа и клеточные системы могут быть использованы для поиска и изучения свойств лигандов различных мембранных рецепторов, что крайне важно для современных фармакологических и биотехнологических разработок.

С полученными в диссертационной работе результатами целесообразно ознакомить следующие организации: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАН, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институт биофизики клетки РАН, Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАН, Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург), Институт фармакологии и биохимии Национальной академии наук Беларуси (Минск).

Сведения о рассмотрении диссертационной работы.

Результаты исследований К.С. Кудряшовой, выносимые на защиту, представлены соискателем в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН и обсуждены на межлабораторном семинаре с участием научно-образовательного центра «Биохимические основы нанобиотехнологий» и лаборатории биоэнергетики 3 февраля 2015 г. (протокол № 2). На основании проведенного обсуждения диссертации подготовлен настоящий отзыв.

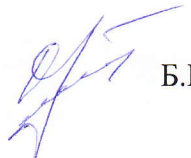
Заключение.

Диссертация К.С. Кудряшовой на тему «РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ПОИСКА БЛОКАТОРОВ ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА KV1» является работой высокого теоретического и экспериментального уровня. Соискателем выполнена законченная научно-квалификационная работа, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей существенное значение для биофизики: предложена и охарактеризована клеточная система для выявления и количественной оценки эффективности действия биологически активных соединений – блокаторов калиевых каналов семейства Kv1. По актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует всем требованиям «Положения о

порядке присуждения ученых степеней» в редакции Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Руководитель научно-образовательного центра
«Биохимические основы нанобиотехнологий»,
заведующий лабораторией иммунобиохимии
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биохимии им. А.Н. Баха
Российской академии наук,
доктор химических наук, профессор

10 февраля 2015 г.

 Б.Б. Дзантиев

Почтовый адрес: ИНБИ РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия

Телефон: (495)954-31-42. Адрес электронной почты: dzantiev@inbi.ras.ru



СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертационной работе Кудряшовой Ксении Сергеевны на тему «Разработка флуоресцентной системы поиска блокаторов потенциал-чувствительных каналов семейства Kv1» представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.02 - Биофизика.

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук
Сокращённое наименование организации в соответствии с уставом	ИНБИ РАН
Почтовый индекс, адрес организации	Ленинский проспект, д.33, стр. 2, 119071, Москва, Россия
Веб-сайт	http://www.inbi.ras.ru/
Телефон	(495)954-31-42
Адрес электронной почты	inbi@inbi.ras.ru
Список основных публикаций работников структурного подразделения, в котором будет готовиться отзыв, по профилю диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	1) Aliverdieva D., Mamaev D., Efendieva M., Snezhkova L. A mitochondrial biosensor for studies of molecularity of rate-limiting step of pore formation by alamethicin mastoparan and melitin. FEBS Journal. 2013; v. 280 (Suppl. 1), p. 258-259. 2) Bekasova O.D., Revina A.A., Rusanov A.L., Kornienko E.S., Kurganov B.I. Effect of gamma-ray irradiation on the size and properties of CdS quantum dots in reverse micelles. Radiation Physics and Chemistry. 2013, v. 92, p. 87-92. 3) Berlina A.N., Taranova N.A., Zherdev A.V., Vengerov Y.Y., Dzantiev B.B. Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2013, v. 405, № 14, p. 4997-5000. 4) Chernyak B.V., Antonenko Y.N., Domnina L.V., Ivanova O.Yu., Lyamzaev K.G., Pustovidko A.V., Rokitskaya T.I., Severina I. I., Simonyan R.A., Trendeleva T.A., Zvyagilskaya R.A. Novel penetrating cations for targeting mitochondria. Current Pharmaceutical Design 2013; v. 19, p. 2795-2806. 5) Aliverdieva D, Mamaev D, Snezhkova L, Sholtz C. Evaluation of molecularity of rate-limiting step of pore formation by antimicrobial

	peptides studied using mitochondria as a biosensor. <i>Toxicol. in Vitro</i>, 2012, 26: 939-949. 6) Artemova, N., Stein-Margolina, V., Smirnova, E., Gurvits, B. Formation of supramolecular structures of a native-like protein in the presence of amphiphilic peptides: variations in aggregate morphology. <i>FEBS Letters</i>, 2012, v. 586, No. 2, p. 186-190. 7) Savitsky A. P., Rusanov A.L., Zherdeva V.V., Gorodnicheva T.V., Khrenova M.G., Nemukhin A.V. FLIM-FRET Imaging of Caspase-3 Activity in Live Cells Using Pair of Red Fluorescent Proteins. <i>Theranostics</i>, 2012; Vol.2(2), pp.215-226 8) Stadnichuk I.N., Yanyushin M.F., Maksimov E.G., Lukashev E.P., Zharmukhamedov S.K., Elanskaya I.V., Pashenko V.Z. Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. <i>Biochim. Biophys. Acta</i>, 2012, 1817, 1436-1445.
--	---