

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Бычкова Максима Леонидовича «Влияние протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC на развитие опухолевых клеток», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика (биол. науки).

Одной из наиболее выраженных особенностей метаболизма опухолей является закисление внешней среды, поэтому ингибирование молекул, позволяющих опухолям адаптироваться к кислому микроокружению, может стать новой стратегией терапии опухолей. Протон-чувствительные каналы семейств ASIC (acid-sensing ion channel) и ENaC (epithelial sodium channel), относятся к большому надсемейству амилорид-чувствительных дегенерин/эпителиальных Na^+ -каналов (DEG/ENaC). Эти каналы в клеточной мембране имеют структуру гомо- или гетеро-тримеров и являются важными сенсорами pH, которые активируются при его снижении и одними из первых реагируют на закисление внешней среды клеток. Однако, эффекты, возникающие в опухолевых клетках при активации протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC, вызванной закислением внешней среды, ранее практически не изучались. Также не исследованы эффекты ингибирования протон-чувствительных каналов на развитие опухолевых клеток.

В работе Бычкова М.Л. показано, что закисление внешней среды стимулирует в опухолевых клетках ток катионов, индуцированный активацией протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC, содержащих субъединицу ASIC1a. Экспрессия субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC каналов DEG/ENaC повышена в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками, а активация протон-чувствительных каналов DEG/ENaC в опухолевых клетках приводит к активации JNK киназы и PI3K/AKT/mTOR сигнального пути, что ведет к усилению деления клеток. Ингибирование ASIC1a-содержащих каналов трехпетельным белком из яда черной мамбы *Dendroaspis polylepis* мамбалгином-2 препятствует появлению в клетках опухолеспецифических катионных токов и тормозит рост и миграцию опухолевых клеток, не влияя на рост первичных нормальных клеток. Мамбалгин-2 ингибирует активность митогенных сигнальных путей и синтез ДНК в опухолевых клетках, что ведет к остановке их деления и индукции в них апоптоза. Мамбалгин-2 взаимодействует с опухолеспецифическим гетеротримерным каналом, образованным ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC субъединицами протон-чувствительных каналов DEG/ENaC и ингибирует токи через гетеротримерный канал ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC значительно эффективнее, чем через гомотримерный канал ASIC1a. С помощью молекулярного моделирования показано, что мамбалгин-2 образует

более устойчивые ионные и полярные/гидрофобные контакты с γ -ENaC(-), а не с ASIC1(-) субъединицей в составе тримерных каналов. Таким образом, мамбалгин-2 может стать новым инструментом для изучения молекулярных механизмов, запускаемых в клетках при активации протон-чувствительных каналов, а также прототипом новых противоопухолевых средств.

Диссертационная работа Бычкова М.Л. состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части с обсуждением полученных результатов, заключения и выводов, списка использованной литературы. Диссертация содержит 117 листов печатного текста, 38 рисунков и 8 таблиц, 201 ссылку в списке литературы.

В обзоре литературы представлены современные данные о состоянии исследуемого в работе вопроса. Автор уделяет внимание не только внутриклеточным сигнальным путям, запускаемым при закислении внешней среды в опухолевых клетках, но и структуре, механизму работы и фармакологии изучаемых в работе сенсоров протонов. Подробно описаны механизмы работы ингибиторов ASIC1a, в том числе и мамбалгина-2, активность которого и исследуется в диссертации.

Материалы и методы в соответствующем разделе описаны достаточно подробно для воспроизведения результатов, использованные методики соответствуют современному уровню развития науки.

Описание и обсуждение результатов разделено на 3 части, посвященные молекулярным механизмам адаптации опухолевых клеток к закислению внешней среды, механизмам, запускаемым при ингибировании протон-чувствительных каналов ASIC1a мамбалгином-2, а также исследованию взаимодействия мамбалгина-2 с гетерокомплексом, состоящим из ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC субъединиц протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC.

В ходе работы впервые были получены следующие основные результаты:

1. Закисление внешней среды приводит к активации протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a и увеличению активности митогенных и про-миграционных сигнальных путей в клетках опухолей (JNK и PI3K/AKT/mTOR путей).
2. Падение внешнего pH приводит к увеличению поверхностной экспрессии протон-чувствительных каналов в опухолевых, но не в нормальных клетках.
3. Мамбалгин-2 ингибирует открытие протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a в опухолевых клетках, тормозит рост и миграцию опухолевых клеток, ингибирует в них активность митогенных сигнальных молекул SNAI1, CD44 и Frizzled4, а также вызывает арест клеточного цикла и апоптоз в опухолевых клетках.

4. Молекулярной мишенью мамбалгина-2 в клетках является опухолеспецифичный гетеротримерный канал ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC. Мамбалгин-2 ингибирует гетеротримерный канал ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC значительно эффективнее, чем гомотример, образованный субъединицами ASIC1a.

5. По данным молекулярного моделирования, мамбалгин-2 формирует более устойчивые ионные и гидрофобные контакты именно с γ -ENaC (-), а не с ASIC1 (-) в составе тримерного канала.

Представленные в диссертационной работе Бычкова М.Л. данные получены с помощью современных и обоснованно использованных методов, экспериментальные данные получены в достаточном числе повторов и подвергнуты статистической обработке там, где это необходимо, выводы основаны на полученных результатах, поэтому считаю, что результаты диссертационной работы являются достоверными. Кроме того, результаты диссертационной работы отражены в 4 публикациях в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и были представлены на международных конференциях. При этом во всех работах Бычков М.Л. является либо первым автором, либо имеет равный вклад в работу. Автореферат полноценно отражает содержание текста диссертации.

Диссертационная работа Бычкова М.Л. выполнена на высоком уровне и заслуживает положительной оценки, однако следует отметить наличие определенных недостатков, несколько не умаляющих работу в целом:

1. В обзоре литературы хотелось бы получить более подробное описание ингибиторов каналов α -ENaC и γ -ENaC.

2. В разделе 2.1 «Антитела и олигонуклеотиды» имеется таблица 4 с описанием антител, использованных в работе, но в дальнейшем изложении методов данные об использованных антителах повторяются каждый раз после упоминания антитела.

3. В работе присутствуют опечатки и неточности. Так, в рисунке 1 и 9 не полностью переведены англоязычные подписи.

4. В разделе 3.3.2 главы «Результаты и обсуждение» рис. 36 представляет собой набор репрезентативных изображений конфокальной микроскопии, и в тексте автор утверждает, что «флуоресцентно-меченный мамбалгин-2 солокализовался с субъединицами ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC, но не с ASIC3 в клетках mel P», говоря о визуальном анализе взаимного расположения различных меток в исследуемых препаратах. Представляется более корректным проведение количественного анализа взаимного расположения указанных меток, по результатам которого можно будет более уверенно говорить о степени корреляции.

Отмеченные недостатки не являются принципиальными.

Диссертационная работа Бычкова Максима Леонидовича на тему «Влияние протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC на развитие опухолевых клеток» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2 – Биофизика (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бычков Максим Леонидович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика

Шидловский Юлий Валерьевич

доктор биологических наук, профессор РАН

ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук.

подпись

ЗАВЕРЯ

САМ ДИРЕ

