

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).

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 закислении внешней среды клеток. В связи с особенностью метаболизма опухолевых клеток, который характеризуется низким pH внешней среды, воздействие на работу данных каналов может оказаться перспективной стратегией для терапии злокачественных новообразований.

В рамках диссертационной работы Бычкова М.Л. исследуются механизмы, запускаемые в опухолевых и нетрансформированных клетках при активации и ингибировании работы протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC.

Работа выполнена на высоком методологическом уровне и органично сочетает использование биофизических и биохимических подходов, а также ряда методов молекулярной и клеточной биологии. Убедительно показано, что падение pH внеклеточной среды приводит к активации в опухолевых, но не нормальных клетках входящего катионного тока, опосредованного по предположению автора работы протон-активируемыми каналами семейства DEG/ENaC, которые содержат субъединицу ASIC1a.

По данным Бычкова М.Л., экспрессия субъединиц протон-активируемых каналов ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC каналов DEG/ENaC увеличена в опухолевых клетках по сравнению с нетрансформированными, а падение pH внешней среды приводит к активации в опухолевых клетках JNK киназы и PI3K/AKT/mTOR сигнального пути, что стимулирует рост и миграцию опухолевых клеток.

Мамбалгин-2 из яда черной мамбы *Dendroaspis polylepis* является ингибитором ASIC1a и предложен автором диссертационной работы в качестве перспективного противоопухолевого средства, блокирующего работу каналов, опосредующих опухолеспецифический катионный ток. Бычковым М.Л. показано, что мамбалгин-2 ингибирует активность митогенных сигнальных путей и приводит к остановке клеточного цикла и индукции апоптоза в опухолевых клетках. В работе Бычков М.Л. высказывает предположение, что мамбалгин-2 взаимодействует с гетеротримерным каналом,

состоящим из субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC. При помощи электрофизиологии показано, что мамбалгин-2 ингибирует токи через гетеротримерный канал, сформированный из субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC эффективнее, чем через канал, состоящий из 3 субъединиц ASIC1a. Посредством молекулярного моделирования предположено, что мамбалгин-2 образует более устойчивые ионные и полярные/гидрофобные контакты с γ -ENaC, но не с ASIC1a субъединицей в составе тримерных каналов. 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. написана по классической схеме и состоит из введения (с описаниями целей и задач работы), не лишённого недостатков обзора литературы, подробного описания материалов и методов, также экспериментальной части с обсуждением полученных результатов, заключением и выводами. Работа изложена на 117 листах печатного текста, содержит 38 рисунков и 8 таблиц. Список используемых источников содержит 201 ссылку. Выводы, сделанные по итогам работы обоснованы и подкреплены соответствующим экспериментальным материалом.

Обзор литературы в целом даёт необходимую информацию о состоянии исследуемого в работе вопроса. Бычков М.Л. уделил необходимое (возможно излишнее) внимание ответом клеток на закисление внешней среды. Также описаны механизмы работы ингибиторов ASIC1a, в том числе мамбалгина-2, активность которого и исследуется в диссертации. При этом, в обзоре литературы отсутствует информация об ингибиторах α - и γ -ENaC, что могло бы оказаться полезным при чтении и анализе данной диссертации.

Материалы и методы в соответствующем разделе описаны достаточно подробно для воспроизведения результатов экспериментов.

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.

Результаты диссертационной работы достаточно полно отражены в 4 публикациях в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и апробированы на

международных конференциях. Автореферат полноценно отражает содержание текста диссертации.

Диссертационная работа Бычкова М.Л. производит хорошее впечатление и заслуживает положительной оценки, однако следует отметить ряд недостатков, связанных, прежде всего, с оформлением работы (множество опечаток, недостатков форматирования текста, примеров некорректного использования некоторых терминов), но не умаляющих достоинства работы в целом.

Также в порядке дискуссии хотелось бы задать соискателю несколько вопросов:

1. Приведенные автором данные подтверждаются результатами молекулярного моделирования, однако использование мутантных форм мамбалгина-2 (в частности, по аминокислотным остаткам в положениях 13-15 и 39, участвующих во взаимодействии с каналом) окончательно бы поставил точку в вопросе об эффективности связывания токсина с каналами различного состава. Не считаете ли Вы целесообразным проведение подобных экспериментов?

2. В работе не обсуждаются возможности регуляции протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC за счет изменения липидного микроокружения. При этом, сам автор работы в литературном обзоре упоминает, что некоторые растительные полифенолы (в частности, кверцетин) и алкалоиды являются низкомолекулярными ингибиторами ASIC1a. Более того, по данным Шмидт и соавторов [Schmidt et al., Biophys. J. 114, 1321–1335, 2018] возможность модуляции DEG/ENaC низкомолекулярными амфифильными молекулами, такими как полифенол ресвератрол и алкалоид капсаицин может быть обусловлена изменениями биофизических свойств мембраны, например, ее текучестью и доменной организацией. Существенные структурные различия упомянутых соединений, их малая селективность и микромолярные ингибирующие концентрации также согласуются с этим предположением. Более того, литературные данные последних лет убедительно демонстрируют, что все упомянутые соединения (кверцетин, ресвератрол, капсаицин) помимо упругих свойств мембраны могут модифицировать и ее электрические свойства, в частности, дипольный потенциал мембраны, что также может отражаться на гейтинге каналов. Принимая во внимание, что опухолевая трансформация клеток сопровождается существенными изменениями мембран, могут ли эти изменения лежать в основе различий в функционировании протон-чувствительных каналов в нормальных и опухолевых клетках, в том числе, отвечать за увеличение «поверхностной экспрессии» протон-чувствительных каналов? Есть ли в литературе данные о различии в чувствительности гомотримерных и гетеротримерных DEG/ENaC каналов к физическим свойствам мембран?

3. На рисунке 38 в диссертации проиллюстрировано взаимодействие мамбалгина-2 с гомотримером ASIC1a и гетеротримером ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC, встроенным в липидные бислои. Какой липидный состав использовали при моделировании в первом и втором случае? С учетом изображенных особенностей связывания мамбалгина-2, анализировали ли возможные взаимодействия токсинов с мембранными липидами, оказавшимися в непосредственной близости, в том и другом случае?

4. В конфокальных изображениях распределение ASIC1a, α - и γ -ENaC имеет диффузный характер – связано ли это с особенностями локализации протон-активируемых каналов, или является следствием неспецифического окрашивания антителами?

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

Остроумова Ольга Сергеевна,

Доктор биологических наук

главный научный сотрудник, заведующий лабораторией моделирования мембран и ионных каналов.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук



руки
Остроумова О.С.
06.04.2023
канцелярией