

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора физико-математических наук Свешниковой Анастасии Никитичны на диссертационную работу Колесникова Дмитрия Олеговича «Роль депо-управляемого входа кальция в регуляции кальциевых каналов TRPC1 и хлорных каналов CaCC», представленную к защите в диссертационный совет 24.1.151.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии Российской академии наук на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – «Клеточная биология».

Работа Колесникова Дмитрия Олеговича посвящена изучению взаимодействия кальций-проницаемых каналов TRPC1 и кальций-зависимых хлорных каналов с системой депо-управляемого входа кальция. Система депо-управляемого входа кальция в клетку является важной частью кальциевой сигнализации, критичной в первую очередь для неэлектровозбудимых клеток. Хотя основой системы является кальциевый сенсор внутриклеточных хранилищ (STIM) и активируемый им канал плазматической мембраны (Orai), в работу системы вовлечены и другие ионные каналы плазматической мембраны, в частности, TRPC. Мутации в генах, кодирующих перечисленные белки, приводят к серьезным заболеваниям, в том числе онкологическим и иммунологическим, в то же время ингибиторы данных ферментов рассматриваются как терапевтические агенты. При всей важности депо-управляемого входа кальция в клетку, механизмы работы этой системы известны только в общих чертах. В связи с этим тема диссертационной работы представляется новой и актуальной.

Диссертация изложена на 130 страницах и состоит из введения (вступления), трех глав, посвященных обзору литературы, описанию материалов и методов исследования, а также изложению результатов, отдельного раздела, посвященного обобщению результатов, а также обсуждению результатов и

заклучению. Список литературы содержит 187 источников, из них 26 статей, опубликованных в 2020-2021 годы. Диссертация проиллюстрирована 30 рисунками и одной таблицей.

По теме диссертации опубликовано три статьи в ведущих отечественных и международных журналах, а также девять работ в сборниках трудов конференций и других изданиях.

Во второй главе проведен подробный анализ современной литературы (преимущественно статьи, опубликованные за последние пять лет). В обзоре приведено подробное описание устройства системы депо-управляемого входа кальция в клетку, при этом описано строение и механизмы функционирования каждого компонента системы, приводится анализ известных данных и подчеркиваются существующие открытые вопросы – в первую очередь роль каналов TRPC и CaCC в функционировании системы.

Третья глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Приведены подробные протоколы приготовления растворов и проведения экспериментов для основной используемой в работе методики – измерения токов через мембрану клетки. Несколько менее подробно, но достаточно основательно, описана культуральная работа и методика наблюдения динамики изменения концентрации кальция в клетках. В целом, используемые методы описаны с необходимой степенью подробности.

В четвертой главе описываются основные полученные в диссертации данные. Было показано, что белки Orai и TRPC1 формируют различные каналы в мембране клеток НЕК, при этом вход кальция через каналы Orai необходим для активации эндогенных каналов TRPC1 при опустошении депо. Были изучены механизмы регуляции активности каналов TRPC1 кальциевым сенсором STIM2. В диссертации были описаны электрофизиологические свойства эндогенных кальций-зависимых хлорных каналов в клетках HEK293, которые на основании своих электрофизиологических характеристик были отнесены к ANO6. Авторы

показали функциональное сопряжение между эндогенными каналами TRPC1 и кальций-зависимыми хлорными каналами. Используя кальциевые хелаторы ВАРТА и EGТА, была проведена попытка оценить расстояния между ними.

В разделе обсуждение проводится критический анализ полученных автором результатов и их сравнение с имеющимися в литературе данными.

Выводы работы целиком и полностью основаны на результатах собственных исследований и логично вытекают из материалов диссертации. Это позволяет признать выводы и положения, выносимые на защиту, достоверными.

У оппонента возникли следующие замечания и вопросы:

1. В обзоре литературы подробно обсуждаются функциональные отличия между Orai1, Orai2 и Orai3, а также связь структуры Orai и его функционирования. Было бы интересно посмотреть на аминокислотную последовательность всех изоформ Orai для лучшего понимания, почему возникают отличия в функционировании этих каналов.
2. Для фиксации концентрации ионов кальция в используемых растворах используется хелатор EGТА, афинность которого к кальцию чувствительна к параметрам раствора. Однако, в работе не приведена формула пересчета концентрации свободных ионов кальция из состава раствора.
3. В разделе 3.3 написано, что «Анализ базальной концентрации ионов кальция проводили при помощи протокола тушения флуоресценции ионами марганца (Mn^{2+}).», однако, не приводится ссылки на описание соответствующей методики или объяснения, как интерпретировать результаты соответствующих наблюдений.
4. В разделе 4.9 приводятся результаты, обосновывающие положение, что каналы CaCC и TRPC1 расположены на расстоянии менее 20 нм, однако, не приведено описание методов, примененных в работе Parekh et al. 2008, на основании которой сделаны расчеты расстояния.

5. В работе присутствует некоторое количество опечаток и несогласованных предложений.

Несмотря на наличие вышеуказанных недостатков, диссертационная работа Колесникова Дмитрия Олеговича «Роль депо-управляемого входа кальция в регуляции кальциевых каналов TRPC1 и хлорных каналов CaCC» является законченной научно-квалификационной работой и соответствует критериям, установленным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации» от 24.09.2013 N 842 (ред. от 11.09.2021) по специальности 1.5.22 – «Клеточная биология», а ее автор, Колесников Дмитрий Олегович, заслуживает присуждения искомой степени.

Официальный оппонент -

д.ф-м. н., старший научный сотрудник

Кафедры биофизики Отделения

экспериментальной и теоретической физики

Физического факультета.



Свешникова А.Н.

28.01.2022

Подпись Свешниковой А.Н. заверено

Селькина Р.Р.

Ведущий специалист
по кадрам

