



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук
(ЦТП ФХФ РАН)

«03» октября 2016 г. Москва, 119991, ул. Косыгина 4, т. (495) 938-25-33
№ 9

УТВЕРЖДАЮ

Директор ЦТП ФХФ РАН,
д.б.н., проф. Ф.И. Атауллаханов

М.П.

«03» октября 2016 г.

ВЫПИСКА
ИЗ ПРОТОКОЛА ЗАСЕДАНИЯ
УЧЕНОГО СОВЕТА ЦТП ФХФ РАН

От "03" октября 2016 г. № 9

Председатель: д.б.н. Атауллаханов Фазоил Иноятович
Ученый секретарь совета: к.б.н. Баландина Анна Николаевна

ПОВЕСТКА ДНЯ

Обсуждение диссертационной работы Колядко Владимира Николаевича «Механизмы избирательного ингибирования контактного пути свертывания крови каноническими ингибиторами» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

ПРИСУТСТВОВАЛИ:

Члены Ученого совета Центра в количестве 16 человек из 18, входящих в состав Ученого совета, а также научные сотрудники Центра

СЛУШАЛИ:

Доклад по диссертационной работе Колядко Владимира Николаевича «Механизмы избирательного ингибирования контактного пути свертывания крови каноническими ингибиторами» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Вопросы заданные докладчику:

Ф.И. Атауллаханов: Каким образом Вы планировали мутации в белке? У Вас ведь не одиночные замены аминокислот, а в каждом мутанте присутствует минимум 2-3 замены относительно «дикого» белка.

В.Н. Колядко: Да, действительно, в каждом мутанте инфестина-4 есть около 3 замен относительно дикого типа. Дело в том, что мы рассмотрели последовательность петли дикого типа и ранее известного мутанта 15. Отталкиваясь от этих двух наборов букв, мы спланировали замены, чтобы получившиеся

Мутанты А, В и С имели, так сказать, промежуточные последовательности. Чтобы выбрать, какую замену внести в конкретную позицию пептида, мы также учитывали сравнение последовательностей для 9 десятков ингибиторов Казала.

Е.И. Синауридзе: На каком основании Вы используете формулу Ченга-Пруссоффа, формулу для конкурентного ингибирования, при вычислении констант ингибирования Ваших ингибиторов? Вы ведь ничего не говорите про то, каков механизм ингибирования этих белков. А эти формулы будут различаться для конкурентного типа ингибирования, неконкурентного и так далее.

В.Н. Колядко: Для дикого типа инфестина-4 и для кукурузного ингибитора уже было ранее показано, что они являются конкурентными ингибиторами фактора XIIIa. Используя формулу для конкурентного ингибирования, мы предполагали, что и все мутанты инфестина-4 являются конкурентными ингибиторами. Это предположение мы подтвердили экспериментально на примере Мутанта В.

Е.И. Синауридзе: Что означает Ваше выражение «непродуктивные взаимодействия»? Мне кажется стоит раскрыть в докладе, что Вы под этим понимаете.

В.Н. Колядко: Согласен с Вами, так и сделаю. Вообще, непродуктивными мы называем такие взаимодействия между ингибитором и протеазой, которые могут мешать прохождению нуклеофильной атаки на расщепляемую связь, а значит, могут затруднять стандартный механизм ингибирования. Так, в Мутанте В боковые атомы аспарагина 11 могут взаимодействовать с кислородом гамма каталитического серина фактора Ха, а также с азотом его каталитического гистидина. Это соотносится с тем, что мутант инфестина не ингибирует фактор Ха. Хорошо, я подумаю, как это более четко выразить в докладе.

А.Н. Баландина: Как я поняла, в работе Вы сделали новые, улучшенные мутанты с повышенной селективностью и применили их в тестах свертывания. Не хватает в Вашем рассказе оценочных суждений. Например, то, что ингибиторы не влияют на генерацию тромбина по пути тканевого фактора – это хорошо, это как раз то, что Вы ожидали от специфических ингибиторов контактного пути. Мне кажется, такого рода оценочные суждения сделали бы Ваш доклад лучше.

В.Н. Колядко: Спасибо большое за это замечание. Я согласен, так и сделаю.

А.М. Шибко: Пожелание по презентации: расшифровать все сокращения, используемые на слайдах.

В.Н. Колядко: Замечание принято, спасибо.

ВЫСТУПИЛИ:

Д.ф.-м.н. Пантелеев М.А. сообщил, что молодой специалист Колядко Владимир Николаевич участвовал в международных и отечественных конференциях, имеет публикации в рецензируемых журналах и является перспективным молодым ученым. Колядко В.Н. удовлетворяет требованиям, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Открытым голосованием единогласно принято решение рекомендовать кандидатуру Колядко В.Н. на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

ПОСТАНОВИЛИ:

1. Утвердить Заключение ЦТП ФХФ РАН по диссертационной работе В.Н. Колядко (прилагается)
2. Рекомендовать работу Колядко Владимира Николаевича к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика на диссертационном совете Д 002.039.01 на базе Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 –
биофизика.

Диссертация «Механизмы избирательного ингибирования контактного пути свертывания крови каноническими ингибиторами» выполнена Колядко Владимиром Николаевичем в лаборатории молекулярных механизмов гемостаза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН). В период подготовки диссертации соискатель Колядко Владимир Николаевич работал в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук в должности научного сотрудника. Колядко Владимир Николаевич обучался в очной аспирантуре Российской академии наук с 25.03.2010 до 24.03.2013 г.

В 2010 г. окончил Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова по специальности «биохимическая физика».

С 2013 г. по настоящее время является научным сотрудником Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук. Удостоверение № 36 о сдаче кандидатских экзаменов «история и философия науки», «иностранный язык (английский)» и «биофизика» выдано 25.12.2013 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

Научный руководитель: Пантелеев Михаил Александрович, доктор физико-математических наук, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных механизмов гемостаза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук. Научный руководитель и тема диссертационной работы утверждены решением Ученого совета ЦТП ФХФ РАН от 10.10.2013 г., Протокол № 7.

По результатам рассмотрения диссертации «Механизмы избирательного ингибирования контактного пути свертывания крови каноническими ингибиторами» принято следующее заключение:

Оценка выполненной работы

Диссертация Колядко В.Н. является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований ингибиторов контактного пути свертывания крови разработаны положения, имеющие актуальное научное и практическое значение для биофизики и биохимии свертывания крови. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Актуальность темы

Фактор свертывания XIIa (фXIIa) является сериновой протеазой, которая автоактивируется в крови на отрицательно заряженных поверхностях и запускает контактный путь свертывания, приводя к наработке активной протеазы тромбина и к образованию в крови сгустка из полимеризованного белка фибрина. Около 10 лет назад было доказано, что фактор XIIa способствует развитию тромбоза – патологии, являющейся ведущей причиной смертности и инвалидности в мире. При этом фXIIa не участвует в нормальном гемостазе – защитном процессе, который запускается при повреждении сосудистой системы. Поэтому регуляция активности фXIIa прямыми ингибиторами может стать новым безопасным методом профилактики и лечения тромбозов. Однако, несмотря на то, что известные ингибиторы фXIIa имеют константы ингибирования от 0,1 до 10 нМ и более, их селективность относительно остальных протеаз свертывания остается малоизученной. Большинство указанных ингибиторов относится к классу канонических и представляет собой белок, который включает как малоподвижный «каркас» ингибитора, так и гибкую петлю, которая конкурентно связывается с протеазой и при этом связывании принимает «каноническую» конформацию. Внесение изменений во взаимодействие в данной петле может приводить к изменениям в ингибирующей активности белка. Однако вопрос о механизмах, обеспечивающих избирательность ингибирования целевой протеазы каноническими ингибиторами, остается нерешенным. Разрешение этого вопроса позволит разработать универсальную стратегию поиска и создания ингибиторов с заданной активностью и селективностью.

Научная новизна

1. Определена селективность ингибирования фXIIa инфестином-4 и кукурузным ингибитором трипсина. В петельный участок полипептидной цепи инфестина-4 внесены аминокислотные замены, которые привели к уменьшению неспецифической активности против плазмина и факторов Xa, IXa и VIIa, в результате чего селективность ингибирования фXIIa инфестином-4 увеличилась в 100 раз. Показано, что аминокислотные остатки мутированной петли при взаимодействии с каталитическими остатками фактора Xa могут подрывающие стандартный механизм ингибирования.
2. Показано, что мутанты инфестина-4 являются конкурентными ингибиторами фXIIa, активность которых может определяться нековалентными взаимодействиями с каталитическим карманом и автолитической петлей протеазы.

3. Показано, что мутанты инфестина-4 специфически блокируют контактный путь свертывания крови и не влияют на свертывание по пути тканевого фактора.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены при личном участии автора. Получение рекомбинантных ингибиторов, создание новых мутантов инфестина-4, планирование и проведение экспериментов по измерению констант Михаэлиса и констант ингибирования, по исследованию плазменного звена свертывания в ряде глобальных тестов гемостаза и по исследованию тромбоцитарного звена с использованием проточной цитофлуорометрии, анализ полученных результатов, а также написание научных статей, тезисов конференций и патентных заявок выполнены лично соискателем. Анализ результатов моделирования структур ингибиторов выполнен при непосредственном участии соискателя.

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов

Для выполнения поставленных задач использовались методы молекулярного клонирования и методы измерения констант ингибирования протеаз свертывания с использованием хромогенного субстрата протеазы. Указанные методы являются общепринятыми при получении канонических ингибиторов и изучении их ингибирующих свойств. Для оценки влияния ингибиторов фХIIа на систему свертывания использовались традиционные методы измерения времени свертывания в плазме и цельной крови, а также современные методы, широко используемые в биофизике свертывания крови, по измерению кинетики генерации тромбина с использованием флуорогенного субстрата и по измерению скорости пространственного распространения фибрина. Применение таких методов позволило доказать специфичность ингибирования контактного пути свертывания изученными ингибиторами.

Для исследования структурных характеристик ингибиторов фХIIа и их комплексов были использованы методы молекулярной динамики белковых структур и белок-белкового докинга, которые применяются повсеместно в такого рода исследованиях.

Для исследования процесса формирования прокоагулянтной поверхности на индивидуальных тромбоцитах использовался современный метод проточной цитофлуорометрии, который позволил выявить падение численности тромбоцитов, способных активировать контактный путь, под действием ингибиторов трансглутаминаз.

Научные положения, выводы, рекомендации полностью обоснованы, достоверны, вытекают из полученных результатов и получили признание в научной литературе и на различных конференциях.

Практическая значимость работы

Полученные результаты работы проясняют механизмы избирательного ингибирования и способствуют созданию новых высокоселективных ингибиторов фактора XIIа. Проведенный анализ показывает, что селективность канонических ингибиторов к целевой протеазе может обеспечиваться взаимодействием с каталитическим карманом и автолитической петлей целевой протеазы и нестандартными взаимодействиями с нецелевой протеазой. Ингибиторы фХIIа с повышенной селективностью, полученные в результате работы, специфически блокируют контактный путь свертывания, позволяя исследовать (пато)физиологическую роль контактного пути, позволяя улучшить качество проведения тестов свертывания и повысить качество хранения компонентов крови.

Ценность научных работ соискателя, соответствие содержания диссертации специальности, полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Работа соответствует специальности 03.01.02 – биофизика на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Материалы и основные результаты диссертации достаточно полно изложены в 12 опубликованных работах Колядко В.Н., из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 патента РФ и тезисы 4 докладов на российских и международных конференциях.

Диссертационная работа Колядко В.Н. удовлетворяет требованиям, установленным п. 14 (об отсутствии заимствований без ссылок на источник и авторов) "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748).

Апробация работы

Результаты работы представлены на следующих конференциях:

1. XXIII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis (23 – 28 июля 2011, Киото, Япония)
2. II Конгресс гематологов России (17 – 19 апреля 2014, Москва, Россия)
3. XXVII International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology (15 – 17 мая 2014, Гаага, Нидерланды)
4. 60th Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH (22 – 26 июня 2014, Милуоки, США)

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. Абаева, А.А. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered "cap" on a surface that promotes attachment to aggregates / А.А.Абаева, М.Санаулт, У.Н.Котова, С.И.Обыденнуу, А.О.Якименко, Н.А.Подоплекова, **В.Н.Колядко**, Н.Самбост, А.В.Мазуров, Ф.И.Атауллаханов, А.Т.Нурден, М.-С.Алесси, М.А.Пантелеев // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – P. 29621–29632
2. **Колядко, В.Н.** Молекулярные механизмы тромбоза. Фундаментальные и прикладные аспекты контактной активации / **В.Н.Колядко**, В.А.Корнеева, Ф.И.Атауллаханов, М.А.Пантелеев // *Биологические мембраны*. – 2014. – Т. 31, Вып. 4. – С. 231–243
3. Korneeva, V.A. Interactions outside the proteinase-binding loop contribute significantly to the inhibition of activated coagulation factor XII by its canonical inhibitor from corn / V.A.Korneeva, M.M.Trubetskov, A.V.Korshunova, S.V.Lushchekina, **V.N.Kolyadko**, O.V.Sergienko, V.G.Lunin, M.A.Pantelev, F.I.Ataullakhanov // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – P. 14109–14120
4. Котова, Я.Н. Роль трансглутаминаз в регулировании формирования фосфатидилсерин-положительной субпопуляции тромбоцитов при их активации / Я.Н.Котова, А.А.Абаева, **В.Н.Колядко**, А.О.Якименко, Ф.И.Атауллаханов, М.А.Пантелеев // *Биологические мембраны*. – 2015. – Т. 32, Вып. 4. – С. 245–252
5. **Kolyadko, V.N.** New infestin-4 mutants with increased selectivity against factor XIIa / **V.N.Kolyadko**, S.V.Lushchekina, T.A.Vuimo, S.S.Surov, R.A.Ovsepyan, V.A.Korneeva, I.I.Vorobiev, N.A.Orlova, L.Minakhin, K.Kuznedelov, K.V.Severinov, F.I.Ataullakhanov, M.A.Pantelev // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, N 12. – P. e0144940

Патенты:

1. Слитый белок тиоредоксина и домена 4 инфестина, способ его получения, экспрессионная плазмидная ДНК, кодирующая слитый белок, и бактерия рода *Escherichia coli*, трансформированная такой плазмидной ДНК: пат. 2528251 Рос. Федерация: МПК С 07 К 19/00, 14/245, 14/435, С 12 N 15/09, 15/62, 1/21, С 12 Р 1/04, 21/00, С 12 R 1/185 / Воробьев И.И., Орлова Н.А., **Колядко В.Н.**; заявитель и патентообладатель ООО «ГемаКор». – N 2012152609/10; заявл. 07.12.12; опубл. 20.06.14, Бюл. N 17
2. Высокоселективный ингибитор контактной активации на основе инфестина 4: пат. 2556116 Рос. Федерация: МПК С 07 К 14/435, 14/81, G 01 N 33/86, С 12 Q 1/56 / **Колядко В.Н.**, Вуймо Т.А., Овсепян Р.А. [и др.]; заявитель и патентообладатель ООО «ГемаКор». – N 2013152864/10; заявл. 28.11.13; опубл. 10.07.15, Бюл. N 19

Тезисы докладов:

1. **Kolyadko, V.N.** Formation of a procoagulant protein coat on the surface of the phosphatidylserine-exposing platelets by transglutaminases / **V.N.Kolyadko**, Y.N.Kotova, F.I.Ataullakhanov, M.A.Pantelev // Abstracts, XXIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (July 23–28, 2011, Kyoto, Japan). – *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2011. – Vol. 9, S. 2. – P. 520
2. **Колядко, В.Н.** Новый высокоселективный ингибитор фактора свертывания XIIa на основе инфестина-4 / **В.Н.Колядко**, Т.А.Вуймо, С.С.Суров, Р.А.Овсепян, В.А.Корнеева, И.И.Воробьев, Н.А.Орлова, К.Кузнецов, К.Северин, Ф.И.Атауллаханов, М.А.Пантелеев // Тезисы докладов II Конгресса гематологов России (17–19 апреля 2014 г., Москва). – *Гематология и трансфузиология*. – 2014. – Т. 59, Вып. 1 (приложение 1). – С. 47–48
3. **Kolyadko, V.N.** A new highly selective factor XIIa inhibitor based on infestin-4 / **V.N.Kolyadko**, T.A.Vuimo, S.S.Surov, R.A.Ovsepyan, V.A.Korneeva, L.Minakhin, K.Kuznedelov, K.Severinov, I.I.Vorobiev, N.A.Orlova, F.I.Ataullakhanov, M.A.Pantelev // Abstracts, XXVIIth International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology (May 15–17, 2014, the Hague, Netherlands). – *International Journal of Laboratory Hematology*. – 2014. – Vol. 36, S. 1. – P. 9
4. **Kolyadko, V.N.** Characterization and development of factor XIIa inhibitors for assaying tissue factor-triggered coagulation / **V.N.Kolyadko**, T.A.Vuimo, S.S.Surov, R.A.Ovsepyan, V.A.Korneeva, S.V.Lushchekina, I.I.Vorobiev, N.A.Orlova, L.Minakhin, K.Kuznedelov, K.Severinov, F.I.Ataullakhanov, M.A.Pantelev // Abstracts, 60th Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (June 22–26, 2014, Milwaukee, USA). – *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2014. – Vol. 12. – P. 45.

Диссертация «Механизмы избирательного ингибирования контактного пути свертывания крови каноническими ингибиторами» Колядко Владимира Николаевича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Заключение принято на заседании Ученого совета ЦТП ФХФ РАН.

На заседании присутствовали члены Ученого совета Центра в количестве 16 человек из 18, входящих в состав Ученого совета, а также научные сотрудники Центра. Заключение принято единогласно, протокол № 9 от 3 октября 2016 г.

Ученый секретарь
к.б.н.



Баландина Анна Николаевна