

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

**Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН
6 декабря 2023 года**

**Защита диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук
Гиголаева Андрея Михайловича**

**По теме: «Молекулярные основы селективности пептидных поровых
блокаторов калиевых каналов»**

Специальность – 1.4.9. Биоорганическая химия

Москва – 2023

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 6 декабря 2023 года.

Председатель
диссертационного совета д.х.н., академик РАН Мирошников Анатолий Иванович

Ученый секретарь
диссертационного совета д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 7.

| | | | |
|-----|------------------------|-----------------------------------|---------|
| 1. | Д.х.н., академик РАН | Мирошников Анатолий Иванович | (1.5.6) |
| 2. | Д.ф.-м.н. | Ефремов Роман Гербертович | (1.4.9) |
| 3. | Д.ф.-м.н. | Олейников Владимир Александрович | (1.5.6) |
| 4. | Д.б.н. | Ажикина Татьяна Леодоровна | (1.5.3) |
| 5. | Д.х.н. | Безуглов Владимир Виленович | (1.4.9) |
| 6. | Д.х.н. | Белогуров Алексей Анатольевич | (1.5.3) |
| 7. | Д.х.н. | Бовин Николай Владимирович | (1.5.6) |
| 8. | Д.х.н., академик РАН | Габибов Александр Габибович | (1.5.6) |
| 9. | Д.х.н. | Генералова Алла Николаевна | (1.5.6) |
| 10. | Д.х.н., академик РАН | Донцова Ольга Анатольевна | (1.5.3) |
| 11. | Д.б.н., член-корр. РАН | Завриев Сергей Кириакович | (1.5.6) |
| 12. | Д.б.н. | Зарайский Андрей Георгиевич | (1.5.3) |
| 13. | Д.б.н. | Лебедев Юрий Борисович | (1.5.3) |
| 14. | Д.х.н., чл.-корр. РАН | Мирошников Константин Анатольевич | (1.5.6) |
| 15. | Д.х.н. | Овчинникова Татьяна Владимировна | (1.4.9) |
| 16. | Д.б.н. | Сапожников Александр Михайлович | (1.5.3) |
| 17. | Д.б.н., член-корр. РАН | Тоневицкий Александр Григорьевич | (1.5.6) |
| 18. | Д.х.н. | Уткин Юрий Николаевич | (1.4.9) |
| 19. | Д.х.н., член-корр. РАН | Цетлин Виктор Ионович | (1.4.9) |
| 20. | Д.х.н. | Шахпаронов Михаил Иванович | (1.4.9) |
| 21. | Д.х.н. | Ямпольский Илья Викторович | (1.4.9) |

Мирошников А.И.:

Защита: Андрей Михайлович Гиголаев, «Молекулярные основы селективности пептидных поровых блокаторов калиевых каналов», на соискание степени кандидата химических наук по специальности биоорганическая химия. Руководитель — Василевский Александр Александрович. Официальные оппоненты — Шайтан Алексей Константинович, член-корреспондент РАН из МГУ, отсутствует, у него лекция; и Амахин Дмитрий Валерьевич, кандидат биологических наук из Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова. Ведущая организация — Институт цитологии Российской академии наук. Пожалуйста.

Олейников В.А.:

Личное дело. Гиголаев Андрей Михайлович, гражданство Российской Федерации, окончил магистратуру биологического факультета МГУ в 2018 году по специальности «Биология», аспирантуру в 2022 году, это уже наша, Института биоорганической химии. С 2021 года по настоящее время младший научный сотрудник лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии ИБХ РАН. Кандидатский экзамен по специальности «биоорганическая химия» — отлично. Работа выполнена в лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии, научный руководитель — руководитель лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии ИБХ Василевский Александр Александрович. По теме диссертации было опубликовано 6 печатных работ в хороших журналах. Объявление о защите размещено на сайте ВАК 4 октября 2023 года, все необходимые документы в деле имеются.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Пожалуйста. 20 минут.

Гиголаев А.М.:

(излагает основные положения диссертационной работы)

Олейников В.А.:

Спасибо. Вопросы? Виктор Ионович, есть вопросы?

Цетлин В.И.:

Не могу сказать, что нет вопросов, поскольку Вы ко мне обратились. Значит, замечательно, интересно, очень лихо меняете структуры пептидов, действующих на каналы, хорошо изучили взаимодействие. И чуть далекий от этого вопрос. Значит, по крайней мере, я помню только такой пептид, зиконотид, конотоксин, который стал лекарством. Прослеживается ли путь от Ваших замечательных модификаций до потенциального лекарства, действующего на калиевые каналы или на какой-то подтип калиевых каналов? И с этим связанный вопрос: в мире люди упираются, чтобы получить селективные блокаторы какого-нибудь определенного калиевого канала, вот у Вас там один, три шесть. Кто из них наиболее, так сказать, интересующий исследователей?

Гиголаев А.М.:

Большое спасибо за интересный вопрос! Значит, да, действительно, есть известный зиконотид, действующий на потенциал-чувствительные кальциевые каналы. И действительно, он применялся для лечения, насколько я помню, эпилепсии. Он блокировал выброс нейромедиатора за счет того, что он блокировал кальциевые каналы. И, конечно, мы опираемся на этот опыт при тех мыслях, которые нам приходят в голову о том, что мы можем, собственно, сделать с токсинами, действующими на калиевые каналы.

И действительно, мы прослеживаем путь, который мы можем пройти, и он примерно такой. Значит, есть небольшое количество данных о том, какие болезни вызываются мутациями в генах потенциал-чувствительных калиевых каналах. И большинство из них — это мутации loss of function, то есть потери активности. А так как у нас поровые блокаторы, то мы, соответственно, не можем их применять в этих случаях. Но есть небольшой процент заболеваний, например, с каналом $K_v1.6$ связаны мутации, которые вызывают, наоборот, приобретение функции, то есть канал в обычных условиях становится более проводимым для ионов калия, и с этим связывают проявление эпилептической энцефалопатии. И в этом случае мы видим, как наш пептид может быть использован для терапии, то есть мы можем использовать наш пептид для подавления активности каналов до такой степени, чтобы она соответствовала физиологически приемлемым значениям проводимости у больных.

Цетлин В.И.:

Спасибо.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Еще вопросы? Роман Гербертович, пожалуйста. Уж, по-моему, все ваши расчеты.

Ефремов Р.Г.:

Да-да, я сразу скажу, что я являюсь соавтором практически во всех Ваших публикациях, и неплохо знаю работу, но все равно вопрос такой. Шли методом, часто, и я это знаю, потому что работали вместе, проб и ошибок. То есть, ну были какие-то гипотезы, я говорю про моделирование, да. Что-то меняли, получалось, не получалось, вы проводили эксперименты, отбирали то, что получалось и улучшали. Но вот после всего того, что сделано, пройден такой путь, много публикаций, все-таки вот хотелось бы услышать Ваше мнение, может быть, какие-то там рекомендации, или там краткий обмен опытом. Появляется как бы задача на какой-то конкретный канал калиевый, там не важно, спроектировать направленным образом действующий лиганд. Вот на что Вы порекомендовали бы людям обращать внимание, то есть что важно, потому что в одних случаях одни взаимодействия важны, там, допустим, электростатические, в других случаях, там, какие-то стерические ограничения, подвижность. Вот что можете сказать, суммируя как бы, потому что показано всего много, все опубликовано, но хотелось бы вот некий синтез от Вас услышать того, как вообще подходить к рациональному дизайну, Ваши замечания, Ваше личное мнение. Спасибо.

Гиголаев А.М.:

Да, спасибо большое за вопрос. Значит, действительно, мы шли вместе с Вами, методами проб и ошибок, большинство данных у нас есть, они вот получены как раз этим методом молекулярной динамики, и, в основном, мы их использовали для объяснения того, как образуются, почему те или иные пептиды оказываются селективными к той или другой изоформе, вот как например вот в этом случае (*показывает на слайде*). Затем мы использовали эти наработки для предложения новых замен и действительно, вот, например в случае RMRH, мы изначально планировали, что он также будет селективным к каналу $K_v1.3$, но в действительности он оказался селективным к каналу $K_v1.1$ и мы это объясняем просто тем, что у нас образуются неожиданные контакты, которые мы не ожидали. И что мы можем сказать по этому поводу это то, что скорее всего просто

мутагенез *in silico* пептидов, он может приводить к неверным трактовкам, потому что в реальности у нас вносимые замены могут влиять и на структуру пептида. То есть раньше мы исходили из того, что мы просто на каркас вносим замены и у нас такая молекула и остается. Однако мы и сами выяснили, что вносимые замены они могут приводить к изменению самой структуры пептидов, и например, здесь показаны две структуры – это Tk-hefu-1 зелененьким и Tk-hefu-11 розовеньким. И вот внесенные замены они вот привели к тому, что у нас молекула немного перекрутилась тут, поменялась немного длина α -спиралей. И в итоге мы бы не смогли моделировать точно без ЯМР. И я хочу сказать, что необходимо делать какие-то реперные точки, на которых при помощи ЯМР, например, проверять структуру пептидов. И конечно же все подвергать молекулярной динамике, чтобы смотреть, как поведут себя молекулы именно после динамики, динамика тоже может показать, как изменится молекула. Ну в общем, это все интересно и сложно, и требует больших усилий, но, возможно, применение новейших методов предсказания молекул мы сможем немного упростить себе задачу.

Мирошников А.И.:

Все?

Гиголаев А.М.:

Да.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Еще вопросы? Пожалуйста.

Козлов С.А.:

Вы думаете, что у Вас проблема с токсином, а может быть у Вас была проблема с моделью, Вы же модель тоже строили. Сколько взаимодействий токсин-модель, не считая Вашей, Вы еще использовали, для того чтобы валидировать сами каналы после моделирования? $K_v1.1$, $K_v1.2$ итд.

Гиголаев А.М.:

Спасибо за вопрос. Когда мы начинали эту работу, была известна только одна структура комплекса токсина с каналами, это как раз вот эта — харибдотоксина и химерного канала $K_v1.2/2.1$, ее мы и использовали в качестве отправной точки. Соответственно, да, ограничение, то, что мы использовали одну модель в качестве отправной точки, имеется. Однако в дальнейшем появились данные о том, как взаимодействуют другие лиганды калиевых каналов с другими каналами. Например, есть такой пептид, проходящий кинические испытания, ShK-186, и вот с ним была получена также структура с каналом $K_v1.3$. И были получены структуры других каналов, также 1.3 был получен, и сравнивая наши модели построенные с вот этой моделью $K_v1.2/2.1$, сравнивая модель $K_v1.3$ с структурой $K_v1.3$ мы не видим больших различий между моделью и реальными структурами. Таким образом, да, мы действительно опираемся только на одну модель, но постфактум сравнивая, мы видим, что структуры каналов не сильно отличаются, они достаточно похожи, чтобы делать предсказания.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Еще вопросы? Да, пожалуйста.

Рогожин Е.А.:

Вот известно, что сам оригинальный пептид пшеницы гарпинин Tk-AMP-X2 является антимикробным. А вот в процессе внесения замен как может меняться антимикробная

активность в том плане, что не приведет ли это к появлению цитотоксичности для мутантных форм этих блокаторов, что-то вроде повлиять на их дальнейшие исследования?

Гиголаев А.М.:

Да, спасибо за вопрос. Значит, действительно, у нас получились интересные результаты с Tk-hefu-11. При тестировании, что мы получили, то, что в концентрации больше 2 мкМ Tk-hefu-11 вызывает лизис ооцитов, на которых тестировались эти пептиды. И мы решили проверить, не появилась ли антимикробная активность или цитотоксичность у этого пептида. Антимикробная активность у него не появилась, и цитотоксичность на других клетках, например, аденокарциноме легких также не была детектирована. И мы связываем это с тем, что возможно гиперэкспрессия каналов в ооцитах, может образуются какие-то кластеры, с которыми взаимодействует пептид, и возможно он взаимодействует с мембраной, вызывая ее не деградацию, но разрушение мембраны, но это разрушение оно очень медленное, мы видим повышение тока утечки, то есть это ток, который идет не через канал, при добавлении этого пептида в концентрации больше 2 мкМ. Для других пептидов такого не было обнаружено. Не знаю, с чем это связано, но действительно такая интересная активность появилась. И конечно, дальнейшие производные Tk-hefu мы будем тестировать на антимикробную активность и цитотоксичность, мы просто будем проверять, не появилась ли у них такая активность.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Еще вопросы есть? Юрий Николаевич, у Вас нет вопросов?

Уткин Ю.Н.:

Нет, спасибо большое.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Василевский, пожалуйста.

Василевский А.А., научный руководитель:

Спасибо большое за возможность. Уважаемые коллеги, с Андреем Михайловичем мы прошли длинный путь. И на моих глазах, и с некоторым участием Андрей из любопытствующего студента, каким пришел к нам в лабораторию выполнять курсовую работу, превратился в пытливого научного сотрудника, который сегодня представляет диссертационную работу. Помимо любопытства, Андрею свойственно трудолюбие, и вы можете его застать поздно вечером за рабочим столом, что-то там делает, о чем-то думает интересном, иногда делится этим со мной, очень часто с другими окружающими. Мне кажется, что эти два качества, любопытство и трудолюбие, они очень важны каждому научному сотруднику, и у Андрея они, разумеется, присутствовали. Еще я бы хотел отметить то, что с Андреем, похоже, невозможно поссориться, и у него, по-видимому, близкие к идеальным сложились отношения со всеми сотрудниками не только нашей лаборатории, но и всего отдела, и это человек, с которым каждый умудряется выстроить благоприятное сотрудничество, и это ему конечно же помогает. Мне кажется, что Андрей заслуживает присуждения искомой степени, и, надеюсь, что уважаемые члены совета поддержат такое мое пожелание. Спасибо большое.

Мирошников А.И.:

Ну, после такой характеристики. Да, спасибо.

Олейников В.А.:

Ну, соответственно, первое, о чем мы поговорим, это заключение организации, где выполнена работа. *(Излагает заключение организации, где выполнялась работа)*. Работа выполнена в нашем институте. Соответственно, в заключении, во-первых, в принципе отражаются некие биографические данные, о которых мы уже говорили. Соответственно, тема диссертационной работы утверждена еще в 2018 году. Работа была рассмотрена на открытом семинаре Отдела молекулярной нейробиологии нашего института. В заключении как раз подчеркивается, что актуальность исследования, следовательно, актуальна, личное участие, опять же. Большая часть лигандов получены лично Гиголаевым. Часть электрофизиологических экспериментов была проведена им лично в лаборатории токсикологии и фармакологии университета г. Лёвен, Бельгия. Ну да, вот тут интерпретация и публикации с активным участием соискателя. Результаты тогда я говорить не буду, потому что здесь уже это отражалось в самом докладе, и в вопросах это все достаточно четко прозвучало. Достоверность, выполнено на высоком научном уровне и так далее. Новизна. Представлен подход к рациональному дизайну новых молекул с заданной селективностью в отношении K_V -каналов при помощи методов молекулярного моделирования. Это современный метод, и, соответственно, получены новые совершенно результаты. Полнота изложения материалов. Была опубликована работа в шести статьях в хороших журналах. Успешно прошла проверку на оригинальность, и в результате в заключение этого семинара, что эта работа рекомендуется к защите. И на заседании 16 человек присутствовало, голосование единогласно, подписал секретарь семинара Опарин, заместитель директора Ямпольский, утверждено директором нашего института академиком Александром Габитовичем Габитовым.

Теперь ведущая организация. *(Излагает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный)*. В качестве ведущей организации у нас здесь выступает Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук. И, соответственно, отзыв ведущей организации положительный, опять же первым пунктом идет актуальность подчеркивается. Общая характеристика, структура диссертационной работы традиционная, не буду перечислять главы. Работа изложена на 122 страницах, 192 литературных источника рассмотрено. Обзор литературы, две смысловые части, подробно обсуждаются молекулярные особенности пептидов и их влияние на аффинность и селективность. Материалы и методы достаточно подробно, результаты и обсуждения. Научная новизна, показано, как при помощи компьютерного моделирования и молекулярной динамики можно не только объяснить повышенную селективность токсинов к той или иной изоформе потенциал-чувствительных калиевых каналов, но и использовать эти подходы для проектирования дизайнерских молекул с заданной селективностью. Дальше, достоверность подтверждена публикациями, шесть публикаций, как было сказано. Диссертация написана хорошо, содержит достаточное количество иллюстративного материала. Но, тем не менее, в порядке дискуссии, хотелось бы получить комментарии автора по следующим вопросам, и тут я зачитываю подробно.

1. Есть ли предположения, как исследуемые селективные блокаторы будут воздействовать на природные гетеромерные каналы.
2. Могут ли предложенные подходы использоваться для дизайна высокоспецифичных блокаторов, различающих различный субъединичный состав гетеромерных каналов.
3. Предполагаются ли какие-либо ограничения на совместное использование селективных пептидных лигандов в составе «коктейля» ингибиторов при исследованиях электрофизиологических профилей различных клеток.
- 4.

Планируется ли применение использованных в работе подходов для дизайна, например, тканеспецифичных блокаторов, эффективно модулирующих работу совокупности каналов, характерных для конкретного типа клеток/тканей, но, в то же время, слабо воздействующих на каналы в других типах клеток/тканей. В заключение, диссертационная работа Гиголаева Андрея Михайловича, представленная на соискание ученой степени – кандидата химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия, соответствует всем критериям, и автор заслуживает присуждения искомой степени. Соответственно, принято на межлабораторном семинаре Отдела молекулярной физиологии клетки Института цитологии РАН и подписано заведующим группы моделирования нейродегенеративных заболеваний лаборатории ионных каналов клеточных мембран отдела молекулярной физиологии клетки, кандидат биологических наук Вигонт В.А. Ну и соответственно, утверждено директором Института цитологии, член-корреспондентом РАН Томилиным.

Мирошников А.И.:

Ну, Андрей, развеите сомнения.

Гиголаев А.М.:

Да, что бы хотелось сказать по поводу вопросов от ведущей организации. Действительно, у нас есть предположения того, как у нас будут воздействовать наши лиганды на гетеромерные каналы. У нас есть данные от американских коллег, что они нашли такой пептид из яда конуса, который действует избирательно на гетеромерные каналы состава, где три субъединицы $K_v1.2$ и одна субъединица $K_v1.1$ или 1.6 . При этом аффинность к этим двум гетеромерам в наномолях, а к одиночным гомомерным каналам в микромолях. И у нас есть наши предварительные данные о том, что харибдотоксин, например, хорошо действует исключительно на гомомерные каналы $K_v1.2$, где все четыре субъединицы $K_v1.2$, а если добавляется хотя бы одна субъединица $K_v1.1$, то у нас аффинность резко падает к таким гетеромерам. И мы работаем над предсказанием активности наших пептидов на гетеромерных каналах также при помощи моделирования. Дальше. По поводу предложенных подходов. Да, мы считаем, что разрабатываемая нами в коллективе с коллегами из лаборатории моделирования биомолекулярных систем мы можем использовать их методы для предсказания активности наших пептидов на гетеромерные каналы. По поводу ограничений в коктейлях. Мы в дальнейшем планируем сконцентрироваться на применении именно одиночных пептидов, селективно действующих на определенные изоформы. Именно потому, что до сих пор до конца не известно распределение этих каналов в нервной системе. Имеются данные транскриптомики, но это не может нам сказать о том, например, в каких частях нейронов у нас наблюдается скопление определенных каналов. То есть, какие-то данные уже имеются, которые были получены при помощи антител и при помощи токсинов. Но мы хотим использовать наши именно селективные пептиды для этой характеристики. А в коктейлях, в принципе, ограничений нет, но мы пока не планируем заниматься этим. И, значит, по поводу тканеспецифичных блокаторов, тоже, как я сказал выше, мы до сих пор до конца не понимаем распределение каналов в нервной системе и в других тканях. И мы хотим сконцентрироваться на изучении распределения отдельных изоформ при помощи наших токсинов, и мы уже сотрудничаем с нашим американским коллегой профессором Оливерой, где мы комбинируем подходы транскриптомики и токсинологии для изучения распределения отдельных изоформ K_v1 каналов в DRG нейронах мыши.

Мирошников А.И.:

Все?

Гиголаев А.М.:

Да.

Мирошников А.И.:

Спасибо.

Олейников В.А.:

Так, в диссертационный совет поступили также отзывы на автореферат диссертации. *(Зачитывает отзывы на автореферат)*. Отзывы полностью положительные. Значит, первый отзыв Узун Марии Михайловны, кандидат биологических наук, ФИЦ Биотехнологии РАН. Ну, здесь тоже все замечательно, но. Поскольку все упоминаемые в работе пептиды были получены в бактериальной системе экспрессии, то возникает несколько вопросов. 1. Какие имеются посттрансляционные модификации у токсинов из яда скорпионов? 2. Насколько сильно такие модификации влияют на связываемость токсинов с каналами? 3. Проявляют ли активность на бактериальных каналах получаемые пептиды в составе гибридного белка? И по поводу второго отзыва. Значит, это подписано доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ Абрамочкин Денис Валерьевич. Тут тоже, значит. При прочтении работы возник вопрос: возможно ли появление сродства к потенциал-управляемым калиевым каналам других подсемейств при внесении специфических замен в исходные пептиды? И я повторяю, в целом отзывы положительные, в конце, значит, все указано, что соответствует диссертация, а автор заслуживает присуждения степени.

Гиголаев А.М.:

Значит, по поводу посттрансляционных модификаций у токсинов из яда скорпионов. На самом деле они тем и удобны, что их можно получать в бактериальной системе экспрессии, потому что у них практически нет посттрансляционных модификаций. Можно выделить из важных, ну из основных, которые чаще всего встречаются, это превращение глутамина в пироглутамат на N-конце и C-концевое амидирование. Но есть противоречащие данные о влиянии этих модификаций на активность, и поэтому надо проверять конечно же рекомбинантные пептиды без этих модификаций на активность. Например, токсин MeKTx13-3, он имеет амидирование на C-конце, и при этом отсутствие этого амидирования не сильно влияет в этом случае на активность рекомбинантного пептида. И также формально можно отнести к посттрансляционным модификациям это образование дисульфидных связей, хотя чаще всего их относят к котрансляционным модификациям. На сколько сильно влияют модификации влияют на связываемость с каналом. Отсутствие пироглутамата на N-конце не сильно влияет на активность токсинов, а C-концевое амидирование, ну вот я выше сказал, оно действительно в одних случаях может сильно влиять на аффинность токсинов из яда скорпионов, а в каких-то случаях, вот как с указанным MeKTx13-3, практически не оказывают влияния. Про проявляют ли активность на бактериальных каналах получаемые пептиды. Мы это не проверяли, однако есть данные о том, что, например, полученный в нашей лаборатории токсин OSK1 в составе химеры с флуоресцентным белком он действует на каналы млекопитающих, а данных по действию на каналы бактерий нет. И, по-видимому, если и взаимодействуют, то они не оказывают значительного физиологического действия, не влияют на экспрессию

этих пептидов в *Escherichia coli*. По поводу появления активности на других каналах, потенциал-чувствительных калиевых каналах. Мы проверяли, например, пептид MeKTx13-3 на каналах K_v2.1, K_v3.1, K_v4.2 и K_v10.1. И они не активны на этих каналах, как и многие α -токсины скорпионов, не α -токсины, а α -КТх, которые действуют на потенциал-чувствительные калиевые каналы, они все в основном действуют на K_v1, и мы не ожидаем, что появится активность на K_v2. Однако в случае изучения каких-нибудь лидерных молекул мы действительно будем проводить широкоформатный скрининг.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Вторым давайте Шайтана. Значит, оппоненты у нас Амахин Дмитрий Валерьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий из Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова по Zoom'у.

Амахин Д.В.:

(Излагает отзыв оппонента. Отзыв положительный). Уважаемые коллеги, меня слышно? Ну, в целом, работа мне очень понравилась, очень четкая, аккуратная. Четыре заявленных представителя K_v1, четыре подобранных лиганда, это очень подкупает. Все необходимые слова я написал, то есть работа, безусловно, достойная, и Андрей Михайлович достоин присуждения кандидатской степени. Ну, поэтому я сразу приступаю к вопросам и замечаниям. Вот, чего, собственно, не хватало в работе. Говоря о K_v1, в первую очередь я, как практикующий нейрофизиолог, думаю именно о потенциале действия, нейронах. И вот как мне кажется в разделе актуальность отсутствующем, хотелось бы, чтобы этот аспект возможности применения этих блокаторов был бы как-то отражен. Есть ли у этих представителей K_v1 какая-то особенная роль в генерации потенциалов действия нейронами, то есть зачем мне вот как практикующему нейрофизиологу могли бы понадобиться вот эти разработанные в работе пептиды. То есть очень хотелось бы, чтобы данная мысль была озвучена, ну если она отсутствует во введении, хотел бы чтобы подзащитный ее озвучил в ответе на вопрос. Следующий вопрос, мне, наверное, все сразу зачитать?

Мирошников А.И.:

Все сразу.

Амахин Д.В.:

Хорошо. На странице 54 приводятся потенциалы реверсии для калиевых токов, которые регистрировались в работе. Почему они около 5-7 мВ? То есть, в экспрессирующей системе был очень слабый трансмембранный градиент ионов калия. А так как в большинстве клеток, экспрессирующих потенциал-зависимые калиевые каналы, то есть в наличии сильный трансмембранный градиент ионов калия, не могло ли это как-то отразиться на результатах работы, и вообще зачем анализировалось изменение потенциала реверсии под действием конкретно MeKTx11-1, для других пептидов этого не делалось. То есть, вы подозреваете возможность изменения селективности канала под действием пептида? И насколько справедливы полученные выводы о характере взаимодействия с пептидом для случая, если бы был сильный трансмембранный градиент концентрации ионов калия? Далее, на странице 60 утверждается, что охарактеризованные пептидные блокаторы могут быть применены для коррекции нарушений, связанных с мутациями, которые приводят к увеличению проводимости канала. То есть хотелось бы, чтобы

подзащитный привел пример таких мутаций и связанных с ними патологий. Четвертое замечание. Рисунок 24Б, кривые доза-эффект для каналов $K_v1.2$ и $K_v1.3$ имеют явно отличающийся наклон, то есть, по-видимому, имеются отличия в коэффициенте Хилла. И на некоторых других рисунках тоже были подобные изменения. Хотелось бы, чтобы подзащитный как-то это прокомментировал. И последний, пятый, вопрос, возможно, он уже прозвучал, но я все равно озвучиваю. В рамках работы все тестируемые пептиды проверялись только на представителях семейства K_v1 . Не могло ли получиться, что, внося модификации в структуру пептида, вы могли снизить их селективность относительно этого семейства, например, получить активность на других представителях K_v ? Ну а в целом, как я уже сказал, работа является современной, актуальной и полученные результаты вносят существенный вклад в понимание механизмов блокады потенциал-зависимых калиевых каналов пептидными лигандами. И мне, как практикующему нейрофизиологу, очень хотелось бы попробовать эти блокаторы в действии, изучить те или иные аспекты генерации потенциала действия нейронами. Ну и безусловно, эта работа очень достойная и удовлетворяет всем необходимым положениям, и подзащитный достоин присуждения искомой степени кандидата химических наук. Спасибо.

Мирошников А.И.:

Давайте, Андрей, отвечайте.

Гиголаев А.М.:

Спасибо большое за такой очень интересный отзыв с интересными вопросами. Значит, что я хотел сказать по поводу первого вопроса. Да, действительно, актуальность и мотивация работы, возможно, выражена недостаточно, с этим я согласен. Однако, хотел бы тогда прояснить сейчас актуальность этой работы. Значит, мы планируем полученные селективные лиганды использовать в нескольких направлениях. Например, их модифицированные версии, такие как флуоресцентные метки, модифицируя флуоресцентными метками, можно использовать для визуализации отдельных изоформ в тканях. Второе, это, как уже упоминалось, это использование полученных пептидов для изучения гетеромерных каналов. И третье, использовать в экспериментах на тканях, которые экспрессируют определенные изоформы, чтобы оценить вклад отдельных каналов в электрические свойства клеток. Здесь мы видим применение наших токсинов и пептидов. Также известно, что блокировка K_v1 каналов вызывает учащение запуска потенциала действия за счет подавления гиперполяризации, то есть каналы K_v1 участвуют в гиперполяризации, если их заблокировать, то не достигается потенциал покоя, и за счет этого у нас учащается генерация потенциала действия. Далее, как примеры я хотел бы проиллюстрировать, что при помощи токсинов было показано, что в медиальном ядре трапецевидного тела Варолиева моста сосуществуют две формы гетеромерных каналов — это $K_v1.1/1.2$ и $K_v1.1/1.6$. Это было показано при помощи изучения влияния токсинов и других лигандов, и по перекрыванию их активности. Также было показано, что, например, канал $K_v1.2$ преимущественно экспрессируется в аксонах, а не в теле нейрона, то есть именно работает в передаче потенциала действия. Далее, по поводу потенциала реверсии. Да, потенциал реверсии у нас имеет такие низкие значения, поскольку эти значения потенциала реверсии они показаны для клеток, находящихся в растворе с высоким содержанием калия, 96 мМ при внутриклеточной концентрации где-то 120 мМ. Мы использовали такие концентрации для изучения потенциала реверсии, поскольку в физиологических условиях мы не можем изучить потенциал реверсии, поскольку при

данных рассчитанных значениях потенциала каналы являются закрытыми. И мы решили проверить именно на 11-1, как на пилотном пептиде, не влияют ли α -токсины на изменение селективности. И мы можем заключить, что раз в таких условиях у нас взаимодействие пептида с каналом не влияло на изменение потенциала реверсии, то и при физиологических условиях также не будет влиять. Далее, по поводу мутаций, вызывающих увеличение проводимости. Действительно, я раньше уже упоминал, в разделе, где говорил про мутации приобретения функции у канала $K_v1.6$, это пока что единственный известный мне пример того, что повышается проводимость у каналов в физиологических условиях. Даже мутация в спирали S6 она вызывает смещение кривой деактивации, то есть при переходе из деполяризации в гиперполяризацию, у нас канал продолжает быть открытым, то есть вызывает еще большую гиперполяризацию, что, видимо, и вызывает эпилепсию. А наш пептид может подавить этот ток до примерно физиологических значений. Далее. По поводу коэффициентов Хилла (*показывает дополнительный слайд*). На данном слайде показаны две кривые, которые упоминались в отзыве. Да, у них действительно отличается наклон, и коэффициент Хилла для этой кривой составляет 1,1, а для этой кривой составляет 0,35. И что мы можем сказать по этому поводу. На самом деле, насколько я знаю, почему пептидные поровые блокаторы калиевых каналов, наши токсины, почему они относятся к одной группе, но обладают разными коэффициентами Хилла на разных каналах, это до сих пор не решенная задача в нашей области. И возможно, что это зависит от того, что в экспериментальных системах, которые используются для изучения аффинности, у нас наблюдается при гиперэкспрессии каналов некая гетерогенность между разными клетками. И что может приводить к искажению ответов и изменению коэффициента Хилла. А также есть предположения о том, что необходимо все измерения проводить на одной клетке для того, чтобы правильно оценивать коэффициент Хилла. Структурные же данные говорят о том, что коэффициент Хилла должен быть 1, потому что комплексы, образующиеся с каналом стехиометрически один к одному, то есть один токсин на один канал. И пятый вопрос. Действительно, мы не ожидаем появления активности на других подсемействах, например K_v2 , K_v3 , K_v7 . И мы проводили, я уже ранее говорил, для MeKTx13-3 мы проводили эксперименты, и он не действует на каналы, которые вышесказанные. И мы не считаем, что появится активность в дальнейшем. Но для лидерных молекул мы, опять же говорю, что мы проведем широкоформатный скрининг для того, чтобы подтвердить наши предположения.

Олейников В.А.:

Спасибо. Ну и как уже было сказано, значит, по объективным причинам, другой оппонент, второй оппонент, официальный, Шайтан Алексей Константинович, отсутствует. Поэтому этот отзыв я зачитаю, если разрешите, я его зачитаю не полностью, а только какие-то существенные моменты. (*Излагает отзыв оппонента. Отзыв положительный*). Значит, естественно, актуальность, новизна подчеркивается. Структура, как уже говорилось много раз, традиционная. Достаточно подробно раздел освещен «Результаты и обсуждение», достоверность. Ну и наконец мы доходим до той части, на которую надо давать ответы. И вот замечания и пожелания. 1) На рисунке 1 приведено филогенетическое дерево, но не указаны параметры его построения, в частности модель замен, использованная для оценки филогенетического расстояния и алгоритм построения дерева (максимальное правдоподобие, максимальная парсимония и т.д.) 2) В оформлении автореферата и текста диссертации автору следовало бы более строго следовать рекомендациям советуемого

ГОСТ, в частности, в общей характеристике работы более подробно указать степень разработанности темы исследования, методологию исследования, степень достоверности результатов, в заключении указать рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, в более общем виде сформулировать положения, выносимые на защиту. 3) Текст диссертации написан местами очень сухим языком и не всегда легок для понимания, часто используется пассивный залог, в результате не всегда понятно, на основе чего делаются те или иные утверждения. Пример со страницы 63 «В свою очередь, анализ данных по мутагенезу VmKTX позволил нам предложить новый вариант. Замена D33H в последовательности VmKTX приводит к увеличению активности по отношению к каналу KV1.3. Производное VmKTX, названное ADWX-1, содержит остатки R11 и H33 и блокирует KV в субнанолярных концентрациях.» В каждом предложении не хватает каких-то слов, например, объясняющих – вариант чего позволил предложить анализ? К увеличению активности чего приводит замена? Производное — это пептид? 4) В представленной работе автор выполнял лишь часть исследований. В частности, молекулярное моделирование проводилось коллегами автора. В то же время первая цель диссертации связана исключительно с моделированием. На мой взгляд цели лучше формулировать так, чтобы их достижение максимально зависело от работы самого автора диссертационного исследования. Несмотря на имеющиеся замечания, считаю, что диссертационная работа Гиголаева Андрея Михайловича, представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности биорганическая химия соответствует критериям, установленным положениями о присуждении ученой степени, а ее автор заслуживает присуждение искомой степени кандидат химических наук по специальности 1.4.9. — Биорганическая химия. Подписано: «Официальный оппонент — Алексей Константинович Шайтан, доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН, доцент кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ. Все.

Мирошников А.И.:

Стандартно, несмотря на то что заслуживает, придется отвечать.

Гиголаев А.М.:

Значит, по поводу деревьев. Для построения филогенетического дерева калиевых каналов человека использовалась программа ClustalOmega на сервере EMBL. Для построения использовался алгоритм ближайшего соседа или присоединения соседей (Neighbor-joining), и для оценки филогенетического расстояния использовалось попарное выравнивание и рассчитывалось число совпадений, то есть матрица замен не использовалась. С комментариями с критикой в сторону оформления автореферата и текста диссертации. Я согласен, что некоторые части в явном виде не выделены, но при этом они есть. Я бы хотел сейчас выделить положения, которые выносятся на защиту (*демонстрирует дополнительный слайд презентации*). 1) Селективные лиганды каналов подсемейства KV1 могут быть получены в результате молекулярного моделирования комплексов каналов с пептидными токсинами скорпионов и сайт-направленного мутагенеза генов пептидов. 2) Аминокислотные замены могут приводить к изменению аффинности пептидных лигандов как напрямую, когда соответствующий остаток пептида взаимодействует с каналом, так и опосредованно — за счет влияния на соседние остатки пептида и образование ими контактов с мишенью. 3) Вносимые аминокислотные замены могут, кроме того, вызывать изменение конформации молекулы, что приводит к

перераспределению молекулярных контактов и изменению активности лиганда. Следующий вопрос касался того, что диссертация написана сухим языком и часто не хватает каких-то частей. Да, я согласен этой критикой. И хотел бы добавить, что в предложении «В свою очередь, анализ данных по мутагенезу VmКТХ позволил нам предложить новый вариант» вариант именно модификаций в структуру MeКТх13-3. Замена в последовательности VmКТХ приводит к увеличению именно его активности к каналу K_v1.3. «Производное VmКТХ, названное ADWX-1, содержит остатки R11 и H33 и блокирует K_v в субнаномолярных концентрациях.» Тут говорится о том, что надо было уточнить, что да, ADWX является пептидным производным другого токсина. По поводу выполнения работы и критики первой задачи я могу сказать так. Да, выполнение первой задачи оно требовало не только моих усилий, но также все делалось в сотрудничестве с коллективом лаборатории моделирования биомолекулярных систем и группы анализа структуры мембранных белков *in silico* ИБХ РАН, за что я им премного благодарен. Однако в первой задаче также говорится и про анализ и предложение аминокислотных замен, что выполнялось при моем непосредственном участии. Все.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Так, следующий вопрос у нас дискуссия. Кто хочет выступить? Все понятно. Идите благодарите.

Гиголаев А.М.:

Я бы хотел выразить благодарность очень многим людям, которые помогли в написании и осуществлении данной работы. В частности, коллективам лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии и лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН за дружественную и располагающую к научной работе атмосферу. А именно Кузьменкову А.И. и Опарину П.Б. за ценные методологические указания и рекомендации, Андрееву Я.А., Козлову С.А., Малеевой Е.Е., Корольковой Ю.В. и Осмакову Д.И. за научно-техническую помощь и рекомендации по работе. Коллективу лаборатории токсикологии и фармакологии университета г. Лёвен, Бельгия, а именно: Пеньёру С., Пиньейро-Жуниору Э.Л. и Титгату Я. — за проведение и помощь в освоении электрофизиологических экспериментов. Коллективу лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН и лично Ефремову Р.Г., Чугунову А.О., Табакмахеру В.М. и Крылову Н.А. за компьютерное моделирование и помощь в подборе аминокислотных замен. Коллективу лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН и лично Феофанову А.В. и Игнатовой А.А. за проведение экспериментов с использованием спектроскопии кругового дихроизма и изучение цитолитической активности Tk-hefu-11. Коллективу лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии и лично Лушпе В.А. и Минееву К.С. за исследование Tk-hefu-11 методами ЯМР-спектроскопии. Коллективу лаборатории инженерии белка ИБХ РАН и лично Некрасовой О.В. за получение рекомбинантных токсинов MeКТх11-1, 3 и их мутантов. Коллективу группы масс-спектрометрии ЦКП «Протеом человека» и лично Торопыгину И.Ю. за получение масс-спектров. Фрадкову А.Ф. за внесение точечных замен в ген канала K_v1.3. Ну и конечно же я выражаю благодарность своему руководителю за многомерную, многостороннюю поддержку в лаборатории. И за работу по этой теме, то, что он контролировал все этапы, давал ценные указания по работе и за все, что располагало к работе: за атмосферу, за наставничество, за дружественную атмосферу.

Мирошников А.И., председатель: Давайте проголосуем.

(Идет тайное голосование).

Олейников В.А., ученый секретарь: *(зачитывает результаты подсчета голосов).*
Гиголаев Андрей Михайлович. Присутствует на заседании 21 член совета, роздано бюллетеней — 21, оказалось в урне — 21, за — 21, против, недействительных — нет.

(Протокол с результатами голосования утверждается единогласно)

Олейников В.А., ученый секретарь: По заключению есть замечания?

(Бовин Н.В. и Овчинникова Т.В. сообщают о незначительных редакторских правках в тексте заключения. С учетом этого Диссертационный совет единогласно принимает заключение).

Заседание Диссертационного совета объявляется закрытым.

Председатель

диссертационного совета


д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь

диссертационного совета


д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

