



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА
заседания диссертационного совета Д 002.019.01
при ИБХ РАН

25 июня 2014 года

Защита диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук **Сачковой Марии Юрьевны** на тему:

«Двудоменные токсины ядов пауков»

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Москва – 2014

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 25 июня 2014 года.

Председатель диссертационного совета
Академик РАН

В.Т. Иванов

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 22 человека, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1. Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6. Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
7. Член-корр. РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
8. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
9. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
10. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
12. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
13. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
14. Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
15. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
16. Д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
17. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
18. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
19. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
20. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
21. Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
22. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Товарищи, занимаем места. Двигаемся дальше по нашей программе. Защита кандидатской диссертации Марии Юрьевны Сачковой.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников В.А.:

(зачитывает документы из личного дела).

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

У нас прямо дублет лаборатории Евгения Васильевича Гришина. Есть ли замечания, вопросы по материалам личного дела? Их нет. Слово диссертанту. Мария Юрьевна, 20 минут в вашем распоряжении.

Сачкова М.Ю.:

(Излагает основные положения диссертации).

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Вопросы докладчику? Александр Сергеевич.

Д.х.н. Арсеньев А.С.:

Мария Юрьевна, Скажите пожалуйста, а кто у вас придумывает названия? Спайдерины – такое звучное название, я не знаю, какой за этим смысл стоит.

Сачкова М.Ю.:

Почему было придумано такое название? Потому что...

Д.х.н. Арсеньев А.С.:

Вопрос: "Кто?"

Сачкова М.Ю.:

Ну, это вместе с моим руководителем, Александром Василевским. А почему такое название было придумано? Потому что ранее другие ученые выделили из ядов скорпионов двудоменные токсины, которые состоят из линейного и цитеин-богатого доменов, и они их называли скорпинами. Мы взяли и по аналогии назвали их спайдеринами.

Д.х.н. Арсеньев А.С.:

А можно второй вопрос? ИСК домен, дисульфид-богатый, сколько там дисульфидов? Это первый подвопрос. Второй подвопрос: «Какая функция этого домена?» Что-нибудь известно?

Сачкова М.Ю.:

Значит, там 5 дисульфидных связей, в этом домене. А функция, значит, он проявляет высокую степень сходства с некоторыми нейротоксинами, однако мы пока не смогли найти никакой определенной функции для него, хотя и проверяли инсектицидную активность, антибактериальную активность. В общем, либо мы ее не нашли, возможно использовали неправильные модели, потому что тестировали, допустим, инсектицидную активность на личинках насекомых, а пауки охотятся, во-первых на взрослых насекомых, и на других насекомых. Это с одной стороны. А с другой стороны, все-таки есть некоторая вероятность, что он потерял активность в результате эволюции, поскольку постоянно происходит поиск новых последовательностей, и есть вероятность, что у этого домена никакой активности нет.

Д.х.н. Арсеньев А.С.:

Там порядка 60 остатков, в этом домене?

Сачкова М.Ю.:

Да.

Д.х.н. Арсеньев А.С.:

Вы не пытались установить, какие дисульфиды, как они образуются, есть ли сходство в способе образования этих дисульфидов с чем-нибудь известным?

Сачкова М.Ю.:

Ну, значит, мы расположение дисульфидов определяли по гомологии.

Д.х.н. Арсеньев А.С.:

Экспериментально не определяли?

Сачкова М.Ю.:

Нет, не определяли экспериментально, но устанавливали, что их десять. Шесть дисульфидов образуют мотив цистинового узла, и вот здесь образуются дополнительные связи (показывает на слайде).

Д.х.н. Арсеньев А.С.:

А на что это похоже?

Сачкова М.Ю.:

Это похоже на токсины окситоксин 1 и окситоксин 2, для них показана активность на кальциевые каналы. Они выделены из яда тоже пауков *Oxyopes*, они содержатся в этом яде.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

У меня вопрос по взаимодействию доменов. То есть вы показали, что интактный токсин активен, каждый домен по отдельности не активен, малоактивен, если их смешать, то активность не появляется. Значит отсюда можно сделать вывод, что для того, чтобы эта вся система работала, они должны как-то взаимодействовать друг с другом, только тогда появляется нечто активное. А что-нибудь известно об этом взаимодействии между доменами? пространственная структура?

Сачкова М.Ю.:

Нет, пока мы этого не делали.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

То есть, никаких данных нет? Ни ЯМРа, ни рентгена?

Сачкова М.Ю.:

Нет, пока нет. Думаю, мы этим потом будем заниматься, но пока нет.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Александр Сергеевич.

Д.х.н. Арсеньев А.С.:

Очень интересная работа, много вопросов. А вот рекомбинантный белок получали? Сравнивали ли его активность с природным?

Сачкова М.Ю.:

Да, значит, он проявляет антибактериальную и инсектицидную активность, но просто природного у нас было мало, мы не могли его померить там на каналах, например. Поэтому нарабатывали полноразмерный токсин. В общем, сравнивали активность.

Д.х.н. Арсеньев А.С.:

Ну вот вопрос: «Рекомбинантный соответствует природному?»

Сачкова М.Ю.:

Да, соответствует.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

По каким критериям?

Сачкова М.Ю.:

По подвижности хроматографической, молекулярным массам, и по активности он соответствует.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Еще вопросы есть? Долгих, а потом Васьковский.

Д.б.н. Долгих Д.А.:

У меня вопрос, касающийся последней части. Вот если можно, выводы, пятый вывод покажите, пожалуйста. Там написано, что анализ ПОКАЗЫВАЕТ. Вот из автореферата это вообще не очень понятно, а из доклада я понял, что это все-таки скорее предположение, чем доказательство. Тем более, что у вас так для каких-то случаев был слабый положительный отбор. Анализ действительно ПОКАЗЫВАЕТ или ПОЗВОЛЯЕТ ПРЕДПОЛОЖИТЬ?

Сачкова М.Ю.:

Ну, анализ показывает во многих случаях достоверный отрицательный отбор. Но тем не менее некоторые последовательности, N-концевые последовательности спайдерин, они

могут быть подвержены положительному отбору. Не все, некоторые. То есть, есть слабая тенденция к положительному отбору.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Вопрос такой: Доказано? Или позволяет предположить?

Сачкова М.Ю.:

Я считаю, что доказано.

Д.б.н. Долгих Д.А.:

А какие-нибудь вероятностные оценки вы можете дать?

Сачкова М.Ю.:

Значит, по поводу спайдерингов, методом Нея-Годжобори была показана достоверная тенденция к отрицательному отбору на всех фрагментах белка-предшественника. И опять же, методом Нея-Годжобори было показано, что если положительный отбор и действует, то только на некоторые фрагменты, на некоторые последовательности этого белка. То есть некоторые линейные домены могут быть подвержены положительному отбору, хотя в среднем наблюдается достоверный отрицательный отбор.

Д.б.н. Долгих Д.А.:

Спасибо.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо.

Васьковский Б.В.:

Вы сказали, что яды пауков представляют собой пептидные комбинаторные библиотеки. А можно ли с помощью подходов современной протеомики построить полный пептидом или протеом ядов пауков? И кто-то, может быть, в мире этим занимается?

Сачкова М.Ю.:

Да, конечно, такие работы делаются. Берутся яды, и определяются все пептиды, которые входят в состав этих ядов. Для многих пауков такое делается, да.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Лебедев.

Д.б.н. Лебедев Ю.Б.:

Я хочу немножко продолжить обсуждение вопроса, заданного профессором Долгих. Мне понравился, напор, с которым развивается гипотеза о молекулярной эволюции. Но я не очень понял, на какие фактические данные эти расчеты опираются. Дело в том, что при сравнении нуклеотидных последовательностей, все равно, каким методом: сравнение

частот синонимичных/несинонимичных замен, или построение деревьев методом поиска максимального правдоподобия, требуется вычисление некоторых базовых вещей. Например, расчет скорости эволюции именно на анализируемый локус в геноме. Для этого, разумеется, все сравниваемые последовательности должны быть гомологичны, а не просто похожи по аминокислотной последовательности. Это должна быть именно гомология нуклеотидно последовательности, общее происхождение. Вопрос мой: рассчитывались ли такие вещи как скорость мутаций в локусах, и вообще, что представлял из себя массив сравниваемых нуклеотидных последовательностей. Потому что в автореферате указаны 20 последовательностей на 5 различных доменов, что я думаю, недостаточно для проведения полностью корректного сравнения. Что представлял из себя массив нуклеотидных последовательностей, сколько их, насколько они гомологичны, и была ли рассчитана скорость мутаций?

Сачкова М.Ю.:

Скорость мутаций не рассчитывалась. А что представлял массив данных... Это были последовательности кДНК или последовательности генов, кодирующие белок-предшественник этих токсинов. И у них очень высокое сходство. Для некоторых последовательностей препро-части были вообще идентичны. То что они гомологичны, это точно, потому что очень высокое сходство, иногда они различаются несколькими точечными заменами. Иногда разница более значительная. По поводу спайдеринов. например, там наблюдается 2 семейства. В каждом семействе более близкие последовательности, а друг от друга эти семейства более далеки.

Д.б.н. Лебедев Ю.Б.:

А сколько полноразмерных кДНК?

Сачкова М.Ю.:

Ну, мы брали 20 последовательностей.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Есть еще вопросы? Похоже, что вопросы кончились. Отдыхайте. Переходим к заслушиванию отзывов. Отзыв ведущей организации.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников В.А.:

(Зачитывает отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук. Отзыв положительный, отзыв прилагается).

Имеются следующие замечания. Раздел материалов и методов написан недостаточно подробно. В тексте диссертации не хватает коротких заключений по каждому этапу работы. В обсуждении был бы полезен раздел, сопоставляющий полученные результаты с мировым уровнем аналогичных работ.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Мне кажется, есть замечания с которыми можно просто согласиться. Но, может, я не прав.

Сачкова М.Ю.:

Соглашаюсь.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Вы согласны?

Сачкова М.Ю.:

Да.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Там, вроде, очевидно. Двигаемся дальше. Александр Александрович, ваша очередь.

Научный руководитель, к.х.н. Василевский А.А.:

Очень приятно здесь оказаться во второй раз сегодня. Мария Юрьевна к нам пришла после окончания кафедры биоорганической химии Московского университета. Она пришла к Евгению Васильевичу и говорит: "Хочу Вас попросить меня в аспирантуру взять". А в итоге, вот, оказалась под моим началом внутри лаборатории. Я должен поделиться с вами своим впечатлением. Мне кажется, что ко мне уже пришел тогда сложившийся научный сотрудник. То есть вот, да, она освоила новые методы, да, очень интересная у нее тематика, очень интересно рассказывает нам про эволюцию токсинов, но при этом и личность была уже сложившаяся, и все вот эти четкость выполнения экспериментов, постановки задач, это все она принесла еще тогда, когда попросилась к Гришину в аспирантуру. Думаю, что здесь я выскажу общее мнение всех сотрудников нашей лаборатории: нам очень повезло, что к Гришину пришла Мария Юрьевна. И еще одно слово. Она чрезвычайно жизнерадостный человек. Значит, вот, человек-позитив. Я не могу себе представить никого, у кого бы с Марией Юрьевной были какие-то натянутые отношения. И этот позитив передается всем участникам нашей небольшой команды и всей лаборатории Гришина. Спасибо.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Есть ли отзыв на автореферат?

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников В.А.:

Поступил один отзыв на автореферат. (Зачитывает отзыв). Вот я считаю, что надо обязательно зачитать, зачитать фрагменты из него. Вот это то ли замечания, то ли пожелания.

Замечания: В таблице 2 автореферата значения dS-dN достигают значения 3.95, что означает, что число синонимичных замен на сайт dS>>1, т.е. по заменам в синонимичных сайтах наблюдается насыщение. При таких высоких значениях dS точная оценка силы

отрицательного отбора затруднена. Основной вывод о преобладании отрицательного отбора не вызывает сомнений.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Там есть на что отвечать? Вы сами как считаете?

Сачкова М.Ю.:

В общем-то, как указано в отзыве, разница между синонимичными и несинонимичными заменами велика, и, как указано в отзыве, это затрудняет оценку силы отрицательного отбора. Однако, мы не проводили оценку силы, и факт отрицательного отбора это не отменяет, как также отмечено в отзыве.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Переходим к официальным оппонентам. Д.х.н. Петр Владимирович Сергиев, МГУ, химфак.

Официальный оппонент д.х.н. Сергиев П.В.:

(Отзыв положительный, отзыв прилагается)

Глубокоуважаемые коллеги, ну, обычно надо начать с формальностей, из каких частей состоит диссертация. Я бы не стал этого говорить, если бы не хотел начать с похвалы в адрес оглавления. Это немножко странно звучит, конечно, но обычно раздел результатов и обсуждения является одним разделом. А в этой диссертации эти разделы разнесены. И это очень правильно и, на самом деле, вообще такая хорошая традиция. Я буду рекомендовать всем другим защищающимся так и делать, потому что объединение этих разделов очень часто ведет к тому, что обсуждение очень скомканное. А здесь мы видим чудесный анализ полученных результатов, вдумчивый. Это очень здорово. (Далее излагает содержание отзыва). Замечание 1: Стоило бы вернуться опять к яду и посмотреть, в каких пропорциях присутствуют реально в яде разные токсины из тех, которые были найдены реально в базе кДНК. Не только тех, которые были выделены, но и родственных. Чтоб понять, какие из них основные, а какие минорные. (продолжает изложение отзыва). Замечание 2: Здесь я бы тоже хотел сделать замечание. Просто предложение, скорей. При анализе активности отдельных доменов очень внимательно была изучена активность по отношению к мембранам и антибактериальная активность. Предположительная активность в отношении ионных каналов, она не была проверена по-настоящему. Понятно, что нельзя все на свете проверить в рамках одной кандидатской диссертации, и понятно, что родственные токсины имеют активность по отношению к кальциевым каналам, но все-таки хотелось бы какое-то доказательство этого предположения увидеть. Замечание 3. И второе, тоже очень мелкое замечание. Оно касается токсинов, состоящих из двух мембран-связывающих частей, которые синергично действовали. Там при определении минимальной ингибирующей концентрации эксперимент касался отдельных доменов, а из литературных данных, правда, из литературных данных той же лаборатории, был взят МИК для полноразмерного токсина. Хотелось бы все-таки, чтобы это было измерено в одном эксперименте, одними руками, чтобы правильно сравнивать. хотя это, конечно, в

общем большим недостатком не является, скорее, предложением. (Продолжает излагать отзыв.) Спасибо!

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Слово диссертанту.

Сачкова М.Ю.:

Большое спасибо Петру Владимировичу за то, что он так внимательно прочитал мою работу и высказал замечания.

Значит, по поводу содержания токсинов в яде. Вообще, эти токсины не являются мажорными компонентами в составе этого яда. На хроматографическом профиле яда видно, что их содержание примерно 0,1 - 0,5%. Выделены были только те токсины, которые наиболее представлены в яде, а те которые мало представлены, выделены не были и были обнаружены в библиотеке кДНК.

Так, значит по поводу активности С-концевого домена, мы попытались обнаружить ее в опытах на антибактериальную активность и инсектицидную активность. Однако пока нам так и не удалось это сделать. С одной стороны, это может быть связано с тем, что объекты были выбраны неправильно, потому что пауки охотятся на взрослых насекомых обычно, а во-вторых, скорее всего, на других насекомых. Поэтому в тех объектах, которые мы взяли, в них не экспрессируются нужные рецепторы. Это с одной стороны. А с другой стороны, действительно, в принципе не исключается вероятность, что С-концевой домен потерял свою активность, и поэтому мы не можем ее найти. Но можно продолжить изучение и попытаться прийти к какому-то определенному выводу.

По поводу минимальных ингибирующих концентраций, да я согласна с этим замечанием, наверно, было бы лучше еще раз проводить этот эксперимент, однако для этого необходимо довольно большое количество пептида, а у нас просто не было этого количества пептида, поэтому мы использовали литературные данные. Наверное, я ответила?

Официальный оппонент д.х.н. Сергиев П.В.:

Да.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Двигаемся дальше. К.б.н. Ирена Игоревна Артамонова, Институт общей генетики. Пожалуйста.

Официальный оппонент к.б.н. Артамонова И.И.:

(Отзыв положительный, отзыв прилагается)

Спасибо. Я постараюсь, наверно, не очень много говорить по диссертации, о ее формальных сторонах, таких как научная значимость, актуальность. Все это уже было несколько освещено здесь, и действительно, все это, несомненно, присуще этой диссертации, и просто не хочется повторяться. Перейду к моему отношению к

диссертации. Диссертация мне, в принципе, очень понравилась. Он, действительно, очень такая обстоятельная, очень логично разработана методика, которая потом логично применена к ядам нескольких пауков. Везде она отлично сработала, на мой взгляд. Везде были выделены и охарактеризованы двудоменные токсины. И, что мне самой лично очень понравилось в этой диссертации, это то, что диссертант не остановился на просто характеристике этих доменов с химической точки зрения, биологической точки зрения, но исследователи пошли дальше и задумались об эволюции. Об эволюции соответствующих генов и соответствующих токсинов. И попробовали проанализировать, как это все появилось, какими механизмами управляется, генерация такого разнообразия токсинов яда пауков, что достаточно важно, естественно, для существования самих пауков. Поэтому дальше я буду говорить, в основном, про эволюционную часть диссертации, которая мне ближе и понятней. Сам факт такого анализа мне очень нравится, и результаты интересны. Конечно, у меня возникло достаточно много мелких нареканий к изложению, прежде всего, этого анализа, который я, собственно, и хотела бы обсудить

Сначала я попробую обсудить вещь достаточно содержательную, и это не отражено в моем официальном отзыве, но просто это место привлекло внимание в докладе, но не было акцентировано в тексте диссертации. Это возможное происхождение гена токсина, сочетающего в себе линейный и ноттиновый модуль. Действительно, гипотеза о том, что линейный домен произошел из интрона, она чрезвычайно привлекательна. И это было бы очень интересно. К сожалению, по крайней мере по тексту диссертации, она, мне кажется, к настоящему моменту не так что бы и доказана. И даже я бы не сказала, что есть довольно много аргументов в ее пользу. Потому что найденный донорный сайт не является каким-то серьезным доказательством того, что эта последовательность вообще может функционировать как донорный сайт, поскольку такие последовательности найти в геноме чрезвычайно просто. И можно довольно много. Соответственно, и значимость такой находки, к сожалению, не велика. Было бы значительно интересней проанализировать гомологию нуклеотидной последовательности, которая лежит в основе этого линейного домена, и попробовать найти гомологов в других родственных пауках, в родственных геномах и проследить за судьбой этого участка. Конечно, если бы был пример, когда такой участок находится в интроне, это был бы очень хороший, очень сильный аргумент в пользу этой гипотезы. К сожалению, практически не доступны геномы пауков, очень мало известных нуклеотидных последовательностей, которые включают гены, кодирующие яды, поэтому этого сделать в данной диссертации не удалось, и пока вообще не возможно. Идея про то, что, наоборот, двудоменный токсин, содержащий два ноттиновых домена, получился в результате слияния двух генов, мне кажется значительно более основательной и значительно более доказанной в данном случае. И вызывает положительные ощущения. И анализ, и представление результатов.

На самом деле я позволю себе немного позанудствовать, просто с целью методологической точности этой работы. С целью ее как бы раскрасить и поднять. И попробую зачитать довольно много мелких нареканий, которые у меня возникли по ходу изложения эволюционной части работы. (Излагает замечания). Во-первых, очень хорошо описаны методы экспериментальные, и, на мой взгляд, несколько хуже написаны методы биоинформатические. В частности, например, использовано много программ, для которых обычно указывается только пакет программ, не указывается ни какие конкретно

программы были использованы, ни какие методы алгоритмические лежат в их основе и практически нигде не указаны параметры, которые использовались, что на самом деле очень важно для воспроизведения результатов, и мне кажется, что в кандидатской диссертации это должно быть. Соответственно, время от времени приводятся выводы сделанные в расчетах, уже в результатах диссертации, и не указывается, конкретно о каких расчетах идет речь. (зачитывает соответствующий фрагмент из отзыва). Непонятно, какие конкретно методы определения вторичных структур использовались.

Больше всего нареканий вызывают таблицы результатов тестов на отрицательный отбор двудоменных токсинов. соответственно, они присутствуют, эти таблицы, в анализе ядов как минимум двух пауков, и, соответственно, это таблицы 7 и 12 диссертации и 2 и 6 автореферата. На самом деле, таблицы, которые наверху на слайде (показывает на слайд), мне так повезло, это некая выжимка из этой таблицы, и по ней более-менее понятно, что сказано. Ну, озаглавлены эти таблицы как "Результаты Z-теста на отрицательный отбор". Я лично не знаю такого теста. И он общепринятым не является. Вот название " Z-тест на отрицательный отбор" несколько удивляет. Даже не то, что удивляет, но оно недостаточно пояснено. Это совсем уж общим методом не является, поэтому хотелось бы дать полную ссылку на изложение метода, теста и на его значимость, разрешение доля характеристики отрицательного отбора.

Здесь видно (показывает на слайд), p-value, неизвестно как посчитанное, и разность $dS - dN$. dS и dN - это частота синонимичных и несинонимичных замен. Это как раз понятно, но обычно вывод делается из их отношения. А здесь представлена разность, и вот хотелось бы пояснений.

В легенде написано, что p - это вероятность того, что нулевая гипотеза о нейтральности будет отвергнута в пользу альтернативной. Конечно, это не то. Это не вероятность того, что мы будем отвергать альтернативную гипотезу. p-value - это вероятность наблюдать такие значения, или более экстремальные для данных величин при условии нейтральной гипотезы. Если эти вероятности очень маленькие, что мы и видим, тогда мы можем отвергнуть нулевую гипотезу.

Про тесты на отрицательный отбор, поскольку была дискуссия после доклада, я позволю себе немножечко остановиться. На мой взгляд выводы об отрицательном отборе на этих последовательностях сомнения не вызывают. То есть там проанализировано достаточное количество последовательностей, и эти последовательности, без сомнения, гомологичны между собой, и в среднем на эти последовательности, без сомнения, действует отрицательный отбор. Просто, анализируя те параметры, которые там косвенно представлены сомнений не вызывают. То, что, возможно, эти параметры посчитаны не очень точно, что встречалось в отзыве на автореферат, действительно, нигде не написано, что делалась поправка на частоту параллельных замен, это обидно, но тем не менее вывода о наличии отрицательного отбора это не убивает. К сожалению, все это довольно плохо написано, из-за чего, я думаю, эта дискуссия и возникла. И не очень хорошо изложено. Я по-прежнему немножко не согласна с методом, который использовался для вычисления отрицательного отбора. не то, что не согласна, а можно было выбрать более распространенный метод, тогда это бы звучало более основательно. Кроме того, поправка Бонферрони нигде не звучала в докладе. В тексте диссертации это есть. Поправка

Бонферрони - это поправка на множественное тестирование. То есть если мы проводим тест одного и того же смысла для большого количества сравнений, то мы должны делать поправку на количество этих сравнений. Для тестов на положительный отбор это вроде бы делалось, судя по результатам. И действительно, там какое-то количество положительных тестов эта поправка убила. Для тестов на отрицательный отбор, судя по тексту диссертации, эта поправка не вовлекалась. Я думаю, что для большинства сравнений это не сыграет никакой роли, и их не так-то было много. Это не десять в какой-то степени, а на самом деле отдельные штуки, ну там дюжина, две дюжины, может быть. Поэтому поправка Бонферрони выводы не убьет в подавляющем большинстве случаев. Но какие-то убьет, и, конечно, корректнее это обсуждать.

Отношение правдоподобия, которое здесь считалось, хорошо и все понятно. Действительно, несмотря на общий отрицательный отбор, который как я еще раз подчеркну, на мой взгляд, не представляет вопроса для этих последовательностей в среднем, возможно, есть позиции, которые подвержены положительному отбору. И, собственно, тесты на отношение правдоподобия именно это и пытаются выяснить. И вот здесь они приведены. К сожалению, недостаточно подробно, опять же, описаны в тексте диссертации, что за модели использованы, и как эти тесты работают. В общем, было бы достаточно интересно и поучительно описать.

Так, и еще немножко всякого странного занудства. Метод построения деревьев везде называется методом ближайшего соседа. Это не совсем так. "Neighbour joining method" называется по-английски, и это не метод ближайшего соседа. Я понимаю, почему диссертант его так назвал, потому что метод ближайшего соседа - это очень распространенный метод классификации и аппроксимации, и это выражение на слуху. Но эти методы не имеют, на самом деле, ничего общего, и "Neighbour joining method" - это метод объединения соседей. То есть мы не оперируем с ближайшим соседом, мы все время пытаемся соседей объединить, и построить для них соответствующую часть дерева. Поэтому этот метод следует называть методом объединения соседей.

Было показано вам дерево сравнения СрТх-токсинов между собой. К сожалению, это филогенетическое дерево использовано, чтобы проиллюстрировать разницу между последовательностями, которые отличаются буквально в единичных позициях, то есть точечными заменами. Филогенетический анализ не очень хорошо оперирует единичными событиями вообще, и в данном случае показывать дерево, на мой взгляд, не очень правильно. Было бы достаточно привести множественное выравнивание, которое бы очень хорошо иллюстрировало бы то, что сказано, сходство этих последовательностей. Или просто матрицу расстояний, например, в числе замен, что тоже было бы значительно понятней.

Достаточно вещь, мне кажется важная, по крайней мере, для молодежи здесь присутствующей. Например, на 72 странице текста написано следующее: "подавляющее большинство пар N-концевых доменов подвергается положительному отбору". Это не замечательная фраза и, прямо скажем, не очень правильная. Потому что, действительно, когда мы анализируем отрицательный отбор, мы просто сравниваем пары последовательностей, и по их разности мы можем судить о тех изменениях, которые произошли в эволюции их общего предка к тем последовательностям, которые мы можем

наблюдать сейчас. Несмотря на то, что метод действует, действительно, именно для пар, говорить, что именно отрицательный отбор действует на пары, это неправильно. Отрицательный отбор, конечно, действует на сами последовательности, и мы всегда не знаем, на какую именно последовательность из этих двух последовательностей, которые эволюционировали от общего предка до настоящего состояния, действует отрицательный отбор. Но тест говорит, что хотя бы на одну из них этот отрицательный отбор действует. Поэтому в данном случае было бы корректней сказать, что в данном случае было бы корректней сказать, что большинство N-концевых доменов подвергаются отрицательному отбору.

Повторюсь, но структура много анализируется, много результатов кругового дихроизма. метод кругового дихроизма позволяет оценить долю последовательности, которая находится в соответствующей конформации. В виде альфа-спирали или бета-структур. Соответственно, не приводятся результаты просто предсказания вторичных структур, которые бы конкретно для каждой последовательности, для каждого остатка предсказали бы их положение. Конечно, точность этих программ не 100%, но достаточно велика, и, на мой взгляд, информативности там больше. И особенно интересно было бы сравнить результаты метода кругового дихроизма и предсказания вторичной структуры для этих спиралей.

Вещь достаточно важная с точки зрения изложения. В диссертации в нескольких местах встречаются фразы, что "последовательности высокогомологичны" и "последовательности идентичны на N%". По-русски так сказать не правильно. Это как сказать: "Девушка немножечко беременна". Соответственно, последовательности либо гомологичны, либо не гомологичны; либо идентичны, либо не идентичны. Соответственно, последовательности гомологичные могут обладать более высоким уровнем сходства, или более низким, и последовательности похожие могут содержать такое-то количество идентичных остатков. Или при таком уровне идентичности быть сходными.

И пятый пункт выводов, который уже немножко обсуждался в дискуссии. Там в первой части выводов сказано, что анализ утверждать отрицательный отбор, и я считаю, что это правда, именно к этой фразе было нарекание. Зато следующая фраза "Предположено, что в ходе эволюции гены модульных токсинов образовались из генов однодоменных токсинов". Действительно, предположено, это не было напрямую доказано в диссертации. И на мой взгляд, такая фраза в выводах не может быть.

Все это, на самом деле, я здесь произносила с такой немножечко педагогической идеей. Это все вовсе не умаляет достоинства диссертации. Диссертация мне очень понравилась, диссертация хорошая. Тест диссертации замечательный, я вообще такого в жизни еще не видела. Практически отсутствуют орфографические ошибки и опечатки. Очень хорошо все оформлено, и очень все красиво. И, на мой взгляд, и по научной части никаких сомнений в том, что эта диссертация достойна, ее автор достоин степени кандидата наук, а диссертация достойна нашей высокой оценки, нет в этом никаких сомнений. Спасибо.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Прошу защищаться.

Сачкова М.Ю.:

Большое спасибо Ирине Игоревне, что очень внимательно прочитала мою работу.

По-поводу эволюции спайдерингов и по поводу интрона. Да, действительно имеется недостаточное количество аргументов в пользу этой гипотезы, так что пока это просто гипотеза. Для пауков *Oxurpes* не известна полная последовательность генома, и только недавно была определена первая полная последовательность генома паука, поэтому не так много информации о геномах, и довольно трудно найти гомологичные последовательности. По тому, что известно, мы не нашли действительно сходных последовательностей с последовательностями N-концевого домена.

По поводу методов исследования. Утверждается, что они описаны недостаточно. Я, наверно, соглашусь с этим замечанием, хотя в большинстве случаев, если мы использовали программы, то мы использовали те значения параметров, которые в них заданы по умолчанию. И большинство программ, которые использованы в работе, они широко распространены, поэтому, в принципе, описания к ним доступны.

По поводу того, что не указано, как рассчитываются вторичные структуры. Они предсказываются с помощью программы *Protean* из пакета *DNASStar* и, в общем-то, это указано в соответствующем разделе Материалов и методов.

По поводу таблиц, в которых описываются результаты анализа методом Нея-Годжбори. Мы использовали программу *MEGA5*, которая широко используется во многих аналогичных работах. В качестве результатов эта программа генерирует таблицы и соответствующие подписи к ним. В общем-то, они и были использованы в диссертации. Z-тест на отбор - это название, которое используется создателями программы *MEGA5*. И это связано с тем, что для оценки нулевой гипотезы о том, что количество синонимичных и несинонимичных замен равны, программа вычисляет значение Z-статистики. По вот такой вот формуле (показывает на слайд: $Z = (dN - dS) / \text{SQRT}(\text{Var}(dS) + \text{Var}(dN))$). Здесь вот эти значения ($\text{Var}(dS)$ и $\text{Var}(dN)$) - это значения дисперсии соответствующих величин, dS и dN . В случае теста на отрицательный отбор, альтернативной гипотезой является гипотеза о том, что количество несинонимичных замен меньше, чем количество синонимичных замен. При этом используется односторонний тест. Исходя из значений Z-статистики, в этом тесте рассчитываются p-значения.

По поводу того, что неправильно сформулировано определение того, что такое p. Я соглашусь с этим замечанием. Однако, как уже было сказано, в подписях к таблице использовали те подписи, которые генерируются программой *MEGA5*.

По поводу поправки Бонферрони. Опять же, соглашусь с этим замечанием, хотя в большинстве случаев, как уже было сказано, результаты не изменятся.

По поводу моделей, которые были заложены в программу *CADEML*. Использовались 4 модели для тестов отношения правдоподобия. M1a, M2a, M7 и M8. В первом тесте сравниваются модели M1 и M2a, а во втором - M7 и M8. В чем разница между этими моделями? Сначала о том, что в этих моделях задействованы разные параметры. Во-первых, это параметр ω . ω - это соотношение несинонимичных замен и синонимичных

замен. Параметр p - это вероятность того, что ω примет определенное значение. Модели M1 и M7, они не допускают действия положительного отбора. То есть в их случае значение ω или меньше 1, или равно 1. В случае модели M1 значения ω дискретны, а в модели M7 значения ω подвержены β -распределению в интервале от 0 до 1. Модели M2 и M8, они предполагают действие положительного отбора, поэтому значения ω могут быть не только меньше или равны 1, но также они могут быть больше 1. При этом модель M8 отличается от модели M2 тем, что в модели M2 значения ω дискретны, а в модели M8 они распределены согласно β -распределению в интервале от 0 до 1, и они принимают значения больше 1. β -распределение дает дополнительный параметр q , который встречается в моделях M8 и M7. Поскольку в тестах отношения правдоподобия количество параметров в моделях отличается на 2 используется χ^2 -распределение с двумя степенями свободы. Модель M0 использовалась для расчета ω в попарных сравнениях.

Далее замечание по поводу филогенетических методов исследования. Да, я с этим соглашусь. Использовался некорректный перевод названия метода.

По поводу филогенетических деревьев. Филогенетические деревья использованы для того, чтобы показать, что последовательности токсинов распределяются на 3 группы. Это замечание касается СрТх-подобных токсинов. Мы использовали метод построения филогенетических деревьев по аналогии с тем, как мы это сделали для спайдерингов. Наверно в этой ситуации было избыточным использовать деревья, однако мы никаких выводов не делаем о филогенетических отношениях внутри групп, а лишь упираем на то, что СрТх-подобные токсины делятся на 3 большие группы. А то что внутри групп происходит, мы не обращали на это внимания.

По поводу вторичных структур. Мы для предсказания вторичных структур использовали программу Protean из пакета DNASTar, и согласно этим предсказаниям большая часть последовательности должна участвовать в формировании α -спиральной структуры. Экспериментальные методы установления вторичной структуры, а именно спектроскопия кругового дихроизма, она является необходимой в данном случае, поскольку мы имеем дело с короткими пептидами, которые в водной среде вообще не упорядочены, и их α -спиральная структура формируется только при взаимодействии с мембранами. В зависимости от того, с какими мембранами они взаимодействуют, доля α -спиральной структуры может быть разная. И это невозможно, или сложно предсказать с помощью программ. Для больших белков, наверно, это делается несколько лучше, для коротких пептидов, там нужно смотреть конкретную ситуацию. Хотя, конечно, метод КД, он не является абсолютно точным, и лучше всего было бы устанавливать пространственную структуру методом ЯМР-спектроскопии, например.

По поводу того, что некорректно использовать "высокогомологичные последовательности", это выражение. С этим я соглашусь.

По поводу того, что не следовало выносить в выводы наше предположение, нашу гипотезу, с этим тоже я могу согласиться.

Наверно, я ответила на все вопросы.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. переходим к общей дискуссии. Кто хотел бы высказаться по поводу? Директивы для голосования? Как нам быть? Как быть ученому совету? Сергей Анатольевич, прошу Вас.

Академик РАН Лукьянов С.А.:

Уважаемые коллеги, ну я хотел бы поддержать позитивное голосование по обоим представленным сегодня работам. По второй работе у меня есть некоторые комментарии. Картинка с эволюцией там, где змеи нарисованы, актинии, пауки. Все-таки у нас диссертации - кандидат химических наук. А эволюция - это очень сложная область знаний. И, скажем. одна эта картинка... нельзя ее вообще рисовать так. Потому что она что-то предполагает, например, что одно из другого выходит, что что-то появилось раньше, что-то позже. А это все на сегодня далеко не очевидные вещи. Что раньше появилось - актинии или пауки. И эволюция сегодня представляется, скорее как куст, исходящий из одной точки, а не как последовательность событий. Уж змеи уж точно никак не от пауков происходят. Я не говорю, что эта картинка претендовала на какие-то смыслы, но когда вот вы залезаете в другую область, будьте осторожней, потому что так же как биологи, наверно, начав обсуждать химические вопросы, могут обсуждать не совсем корректные вещи. И в общем вот эта часть - сравнение скорости у змей или пауков, и актиний, мне кажется, что она и лишняя, и не очень корректно сформулированная. Зато сами работы очень интересные, в основе вот этих анализов структур, поэтому вот я, возвращаясь к началу, целиком поддерживаю позитивное голосование. Спасибо.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Какие-нибудь иные точки зрения? Тогда мы созрели для голосования. Тогда я только дам возможность диссертанту последнее слово сказать, и далее мы будем голосовать.

Сачкова М.Ю.:

Я хочу поблагодарить многих людей, которые помогли мне с разных точек зрения в осуществлении моей диссертационной работы.

Во-первых, хочу сказать большое спасибо заведующему лабораторией Гришину Евгению Васильевичу за возможность осуществить эту работу. Моему научному руководителю Василевскому Александру Александровичу за очень интересную тему и разностороннюю помощь на всех этапах этой работы. Хочется поблагодарить Тихонова Дениса Борисовича, в лаборатории которого осуществлялся отзыв ведущей организации. И оппонентов Сергиева Петра Владимировича и Артамонову Ирену Игоревну за тщательное и критическое прочтение моей работы. Хочу сказать спасибо всем сотрудникам лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов за полезные советы и рабочую атмосферу. Неоценимую помощь в проведении экспериментов оказали Славохотова Анна (установление последовательности генов) и Королькова Юлия Владимировна (разделение ядов пауков). Еще благодарю сотрудников лаборатории протеомики института биоорганической химии и особенно Ковальчука Сергея Игоревича за химический синтез пептидов. А также сотрудников лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии

биомолекул нашего института за помощь в изучении антибактериальной активности пептидов и спектры кругового дихроизма. А также большое спасибо моим родным и друзьям за моральную поддержку и оптимизм, без которых эта работа вряд ли могла бы быть завершена. Спасибо.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Объявляем перерыв для голосования. Просьба членам диссертационного совета не расходиться, мы еще послушаем Сергея Анатольевича по поводу предложенной диссертации. Голосуем.

(Идет голосование)

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников В.А.:

Счетная комиссия сделала свою работу. После того, как мы объявим результаты, надо будет еще заключение обсудить.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Заключение утвердить? Правильно я понимаю?

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников В.А.:

Да. (Зачитывает результаты голосования). Сачкова Мария Юрьевна, присутствовало – 22, роздано – 22, оказалось – 22, за – 22, против нет, недействительных нет.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Кто-нибудь возражает против утверждения этого протокола? Возражающих нет. Протокол утвержден. Поздравим диссертантов с успешной защитой. Теперь мы должны либо согласиться, либо скорректировать проекты заключения совета, которые были на руках у членов ученого совета. Есть какие-нибудь замечания к тому, что нам предлагалось? Я что-то не вижу. Ну тогда утверждаем и завершаем на сем нашу процедуру. Спасибо всем. Объявляется летний перерыв до осени.

Председатель

диссертационного совета

Академик РАН



Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь

диссертационного совета

Доктор физ.-мат. наук

Олейников Владимир Александрович