

«Утверждаю»

директор ИЭФБ РАН
академик Веселкин Н. П.



28 мая 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Сачковой Марии Юрьевны «Двудоменные токсины ядов пауков», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Актуальность работы. Изучение ядов пауков является актуальным, поскольку они являются источниками веществ, имеющих важное прикладное значение в качестве возможных лекарственных препаратов или инструментов изучения нервной системы. Однако на данный момент изучена лишь небольшая часть полного разнообразия токсинов.

Большинство известных пептидов ядов пауков можно отнести к одному из двух типов: богатые дисульфидными связями нейротоксины с ноттиновой (или ИСК) укладкой, либо линейные цитотоксины. Однако недавно были обнаружены токсины, построенные двух доменов. Структура каждого домена соответствует «обычному» токсину (например, два ИСК домена или ИСК домен с линейным цитолитическим модулем). Именно изучению двухдоменных токсинов посвящена диссертационная работа М.Ю Сачковой.

Характеристика работы. Диссертация Сачковой М.Ю. построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Выводы, Список литературы и Благодарности.

Обзор литературы содержит введение и четыре основных главы. В главе «Состав яда пауков» дан краткий обзор известного разнообразия полипептидных токсинов пауков. Последующие главы «Организация белков-предшественников токсинов», «Гены токсинов животных» и «Эволюция токсинов белковой/пептидной природы» посвящены полипептидным токсинам наиболее изученных групп ядовитых животных. Такой разносторонний подход формирует целостное представление о месте токсинов пауков среди животных токсинов и необходим для дальнейшей интерпретации результатов, полученных автором.

Раздел «Результаты» также состоит из пяти глав. Глава «Токсины пауков рода *Oxyopes*» посвящена выделению, исследованию структуры и активности нового класса двудоменных токсинов из яда *Oxyopes takobius* – спайдеринов. Спайдерины состоят из N-концевого линейного и C-концевого ноттинового доменов. Автором был получен рекомбинантный токсин OtTx 1a, а также его отдельные домены. Была обнаружена инсектицидная и антибактериальная активность, обеспечиваемая линейным доменом. В главе «Гены двудоменных токсинов пауков рода *Oxyopes*» описывается структура генов, кодирующих спайдерины, а также приводится анализ разнообразия токсинов этого семейства и механизмы их молекулярной эволюции. Гены спайдеринов, как и подавляющее большинство изученных генов пептидных токсинов пауков, не содержат интронов. В общей сложности с помощью анализа кДНК из ядовитых желез пауков *O. takobius* и *Oxyopes lineatus* и определения последовательностей генов было обнаружено 20 последовательностей спайдеринов, образующих две группы. С помощью анализа этих последовательностей было показано, что положительный отбор не является ярко выраженной тенденцией среди спайдеринов, хотя эпизодическое воздействие положительного отбора можно зафиксировать на линейных доменах.

В главе «Выделение новых двудоменных токсинов из яда паука *C. punctorium*» автор описывает структуру и активность новых представителей CrTx-подобных токсинов. В следующей главе «Гены двудоменных токсинов *C. punctorium*» приводятся результаты анализа структуры генов CrTx-подобных токсинов, их разнообразия и молекулярной эволюции. Как и в случае со спайдеринами, гены двудоменных токсинов *C. punctorium* не содержат интронов. Всего было найдено 12 новых последовательностей CrTx-подобных токсинов, образующих 3 группы. Эти токсины подвержены действию отрицательного отбора.

Глава «Двудоменные токсины паука *L. tarabaevi*» посвящена исследованию механизма действия двудоменного цитоинсектотоксина 1a, изучение которого было начато ранее. Показано, что для его инсектицидной активности необходимы оба модуля, а высокая антимикробная активность обеспечивается синергией двух модулей.

В соответствующем разделе диссертации автор приводит полное и разностороннее обсуждение результатов. Имеется глава, посвященная обсуждению трудностей, возникших при получении рекомбинантных полипептидов. Значительное внимание диссертант уделяет эволюционным аспектам формирования разнообразия двудоменных токсинов, а также и возможным путям их появления.

Достоинства работы. Хотя исследованию токсинов посвящается много работ, угол, под которым рассматривается проблема, представляется оригинальным и продуктивным. Вместо простого рассмотрения разных компонентов определенного яда, автор получает и обобщает данные по токсинам определенного класса из многих организмов. Это позволило автору получить новые интересные данные и сделать интересные выводы о молекулярной эволюции этих важных пептидов. Хочется особо отметить высокую «плотность текста» диссертационной работы. Как в обзоре литературы, так и при описании результатов автор избегает пространных общих рассуждений. Напротив, текст содержит большое число конкретных данных. Несмотря на это, текст хорошо структурирован и легко читается. Надежность полученных данных, достоверность и значимость выводов работы не вызывает сомнений.

Недостатки. Несмотря на высокий уровень самой работы, текст диссертации не лишен недостатков. Раздел материалов и методов написан достаточно подробно, но представляет собой практически справочный материал. Поскольку диссертация является квалификационной работой, представляется целесообразным давать в работе разбор возможностей и ограничений разных методов, обосновать на этой основе выбор конкретных методик, наиболее адекватных поставленным задачам исследования. К сожалению, этого сделано не было. В тексте результатов явно не хватает коротких заключений по каждому этапу работы. Наконец, в обсуждении был бы полезен раздел, сопоставляющий полученные результаты с мировым уровнем аналогичных работ.

Следует отметить, что перечисленные замечания не влияют на сделанные выводы и не снижают общего положительного впечатления от работы.

В целом, диссертация Сачковой Марии Юрьевны «двудоменные токсины ядов пауков» выполнена на высоком методическом уровне и в целом является завершенным фундаментальным исследованием. Был обнаружен класс двудоменных токсинов с неизвестной ранее комбинацией доменов – спайдеринов. В результате работы найдены новые представители СрТх-подобных токсинов. Исследована биологическая активность спайдерина OtTx 1a и цитоинсектотоксина 1a. Впервые проведен анализ механизмов молекулярной эволюции двудоменных токсинов и выдвинуты гипотезы об их появлении.

Результаты работы докладывались на российских и международных конференциях и были опубликованы в международных рецензируемых журналах.

Диссертационная работа Сачковой Марии Юрьевны соответствует требованиям п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант несомненно заслуживает

присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 –
Биоорганическая химия.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории биофизики синаптических
процессов ИЭФБ РАН 26 мая 2014 г.

Заведующий лабораторией
биофизики синаптических процессов,
доктор биологических наук

Тихонов Д.Б.



Подпись руки Тихонова Д.Б.
Удостоверено
Зав. канцелярией
28.05.2014
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук