

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Кузьменкова Алексея Игоревича «Токсины яда скорпионов *Mesobuthus eupeus* и
Orthochirus scrobiculosus, действующие на калиевые каналы»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия»

Диссертационная работа А.И. Кузьменкова посвящена изучению токсинов скорпионов, действующих на калиевые (K^+) каналы. В работе можно выделить три основных направления: а) создание базы данных блокаторов K^+ каналов (Kalium), б) выделение и характеристика токсинов из скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Orthochirus scrobiculosus* и в) создание нового бимолекулярного инструмента на основе химеры флуоресцентного белка и блокатора K^+ каналов (eGFP-OSK1). Диссертационная работа А.И. Кузьменкова имеет классическую структуру и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 160 страницах, содержит 51 рисунок и 17 таблиц. В библиографии диссертации представлено 434 источника.

Обзор литературы имеет четкую организацию и посвящен подробному описанию классификации, структурным и функциональным особенностям K^+ каналов, разнообразию лигандов, действующих на них, а также возможным способам применения пептидных лигандов. Обзор литературы сделан на высоком уровне, что подтверждается большим количеством цитируемой литературы (порядка 390 источников) в широком временном диапазоне: от классических работ 50-х годов XX века до современных исследований. Отдельно стоит отметить тот факт, что все иллюстрации к диссертационной работе, в том числе в обзоре литературы, подготовлены диссертантом самостоятельно и являются оригинальными.

В диссертационной работе диссертантом использовался широкий арсенал современных молекулярно-биологических, физиологических и физико-химических методов, особое место среди которых занимают различные виды хроматографии. Описание генно-инженерных подходов по созданию химерного флуоресцентного белка eGFP-OSK1 сопровождается схемой-иллюстрацией для усиления визуального восприятия материала. Методологическая часть свидетельствует о высоком профессиональном уровне диссертанта, а используемые подходы являются актуальными и используются в современной научной практике. Полученные результаты, их обсуждение и выводы полностью соответствуют поставленным целям.

При знакомстве с работой у меня возник ряд дополнений, замечаний и вопросов, которые я бы хотел обсудить с диссертантом.

Дополнения

1. Во введении следовало бы больше внимания уделить роли трансмембранного градиента K^+ и его эволюционного происхождения. В частности, гипотеза академика Наточина Ю.В. предполагает, что протоклетки возникли в термальных источниках на суше, где концентрация K^+ высока, а уже потом вышли в океан богатый Na^+ . Клетки выработали механизмы поддержания K^+ градиента с помощью насосов, то есть с затратой энергии АТФ. Высокая внутриклеточная K^+ концентрация необходима для белкового синтеза. При этом, активация калиевых каналов приводит к выходу K^+ из клетки. Уже прокариоты научились использовать выход K^+ для передачи сигналов. В частности, K^+ сигнализация была описана в бактериальных пленках. Внутри такой пленки выход K^+ из одной бактерии приводит к деполяризации соседней и активации в ней потенциал-зависимых K^+ каналов.
2. Роль K^+ каналов в физиологии возбудимых мембран существенно шире, чем участие в формировании потенциалов действия. Например, А-тип K^+ каналов в совокупности с спонтанно активными Na^+ каналами вовлекаются в подпороговые флуктуации мембранного потенциала интернейронов. Таким образом, у этих клеток нет стабильного потенциала покоя. Небольшой постоянный ток в данном случае приводит к большим изменениям амплитуды флуктуаций потенциала на мембране. Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы открываются при повышенной активности нейронов, в частности при эпилептиформных разрядах, таким образом, их подавляя. Стимуляция данных каналов или их избыточная экспрессия могут быть подходом к лечению эпилепсии. Однако, увеличенный выход K^+ при повышенной активности калиевых каналов способен приводить к накоплению K^+ во внеклеточной среде, развитию распространяющейся депрессии (возникает при мигрени) и судорогам. Из этого следует, что экспрессия K^+ каналов в разных типах клеток должна быть четко сбалансирована.

Замечания

1. Статистические данные представлены не в соответствии с общепризнанными нормами. В подписях к рисункам не указано, что обозначают разбросы (стандартная ошибка среднего или что-то еще). Не указано какой использовался статистический тест для оценки достоверности различий. Так же, наличие достоверных различий не обозначено. Обычно, используются звездочки: $*p < 0.05$. То же самое касается таблиц. Что за значения стоят после « \pm »?

2. Диссертант пишет, что в яде пауков *Poecilotheria fasciata* и *Pterinochilus murinus*, не было обнаружено лигандов к Kv1.3 поскольку цельные яды этих пауков не вытесняли eGFP-OSK1. Потенциально этот эффект может быть также объяснен либо более высокой константой диссоциации токсинов из яда пауков, либо очень низкой концентрацией лигандов Kv1.3 в яде пауков. При этом в работе не указано в какой концентрации добавлялся цельный яд. Отсутствует положительный контроль, показывающий действие яда пауков в данной концентрации на других системах.
3. На рисунке 48 в названии оси Y используется сокращение, которое не было расшифровано CD8-PerCP-Cy5.5

Вопросы

1. В качестве первой причины выбора блокатора калиевых каналов OSK1 из яда скорпиона *O. scrobiculosus* указано то, что он действует на несколько изоформ Kv каналов и K_{Ca}3.1. Обычно неспецифичность лиганда рассматривается как недостаток. Почему диссертант считает это достоинством в данном случае?
2. Почему средняя интенсивность флуоресценции обозначена I_{cp} ? Буква I обычно используется для обозначения силы тока, тогда как для обозначения интенсивности флуоресценции используется F . Так же необходимо в подписях под рисунками объяснить, что I_{cp} обозначает флуоресценцию.
3. С чем может быть связано отсутствие eGFP-OSK1 эффекта на Kv 1.2, который есть у OSK1? Почему изменения свойств токсина в составе химерной молекулы произошло только в отношении одного типа каналов? Ответ может быть важен для понимания работы канала.
4. На рисунках 46 (Визуализация Kv1.3 на поверхности клеток НЕК293Т) и 47 (Локализация Kv каналов с помощью eGFP-OSK1 на вибротомных срезах мозжечка крысы) видна слабая флуоресценция и на контрольных изображениях. С чем это связано? Нужно указать, что все изображения получены при одинаковых условиях (параметрах оптической системы).
5. Локализация Kv каналов с помощью eGFP-OSK1 в мозжечке является очень интересным практическим результатом. К сожалению, диссертант никак не обсуждает смысл данного результата. Хотелось бы услышать интерпретацию данного результата и возможную физиологическую значимость. Еще мне непонятно как идентифицировались *pinso terminale*.
6. Можно ли на основе eGFP-OSK1 сделать сенсор активности Kv каналов? Например, добиться того, чтобы токсин связывался с каналом только в открытом состоянии. Это бы позволило существенно расширить область применения конструкции.

Считаю, что мои вопросы и замечания носят чисто технический характер и ни в коей мере не умаляют достоинств работы.

Все результаты работы представлены на 11 международных и российских конференциях, а также опубликованы в пяти статьях в научных журналах, входящих в перечень, утвержденный Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций. Содержание диссертационной работы в полной мере соответствует специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. Содержание автореферата соответствует основным целям и задачам, а также выводам диссертационной работы и в полной мере отражает результаты проведенного исследования.

Диссертационная работа А.И. Кузьменкова полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 24.04.16 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а сам диссертант, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Директор НИИ Нейронаук Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, руководитель лаборатории внесинаптической передачи, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН

А.В. Семьянов

603950, Россия, Нижегородская обл., г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, к. 7
Тел. (831) 462-3764
E-mail: semyanov@neuro.nnov.ru

Подпись Алексея Васильевича Семьянова заверяю.
Ученый секретарь Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского



Л.Ю. Черноморская

15 ноября 2016 г.