

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»

Исследования природных токсинов пептидной природы и их взаимодействие с мембранными каналами клеток актуальны не только для исследования принципов взаимодействий пептидов с мембранными белками, но и имеют большой прикладной потенциал.

Диссертационная работа А. И. Кузьменкова удачно сочетает эти два направления исследований при изучении токсинов яда двух видов скорпионов. Было проведено систематичное разделение компонентов яда скорпионов *M. eupeus* и *O. scrobiculosus*, осуществлена идентификация токсинов КТх пептидной природы в нём с помощью комбинации современных транскриптомных и протеомных подходов. Полученные результаты были не просто проанализированы, но и собраны воедино в специализированную базу данных по токсинам, что позволило объединить эти данные с уже имеющимися в литературе. Накопленный опыт работы с токсинами позволил автору сконструировать новый инструмент для исследования калиевых каналов объединив две молекулы - один из токсинов и зеленый флуоресцирующий белок – в одну молекулу, названной eGFP-OSK1. Автор показал, что такой биомаркер можно использовать с высокой эффективностью при проведении целого ряда исследований, например, для поиска специфических лигандов K^+ каналов, для детекции изменения количества ионных каналов при развитии различного рода связанных с ними заболеваний и т.п. В работе приведены результаты по успешному применению eGFP-OSK1 в скрининговых технологиях для определения средства блокаторов K^+ каналов, для визуализации K^+ каналов на срезах мозжечка крысы и на поверхности Т-лимфоцитов мыши. Подготовленная А. И. Кузьменковым диссертация отражает большой объём проведенной им теоретической и экспериментальной работы.

Диссертационная работа А. И. Кузьменкова включает все необходимые разделы: 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 представлен в виде энциклопедического обзора данных по калиевым каналам, включая общее описание их структуры, доменной организации, классификации и механизма работы каналов. Отдельно приведены сведения по лигандам K^+ каналов и

практическом применении полипептидных лигандов этих каналов. Подчеркнуто применение лигандов K^+ при различных патологиях. Обзор литературы в работе проведен на хорошем уровне и дает адекватное представление об объекте исследования. Рассмотрено впечатляющее число публикаций (почти 390), включая результаты исследований последних лет. Материал хорошо структурирован и иллюстрирован, изложен четко, приведенные понятия и методологии позволяют эффективно разобраться в результатах диссертационной работы. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации автора в области биоорганической химии.

Раздел «Материалы и методы» заслуживает самой высокой оценки. Большое количество используемых автором молекулярно-биологических и физико-химических методов, включая работу с природными пептидами, их очистку и идентификацию, проведение физиологических тестов и многое другое, производит очень хорошее впечатление. В разделе детально описаны генно-инженерные подходы к созданию химерного флуоресцентного белка eGFP-OSK1 и его тестированию на клетках. На мой взгляд, этот сконструированный белок и возможности его использования на практике является изюминкой представленной работы. В целом можно сказать, что методическая часть отражает как большой объем профессиональной работы, выполненный диссертантом, так и общий высокий экспериментальный уровень работы.

Полученные А. И. Кузьменковым результаты и их обсуждение разделены автором на два самостоятельных раздела. В первой части включены главы, посвященные созданию специализированной базы данных КТх-Kalium по классификации пептидов, взаимодействующих с K^+ каналами, анализу транскриптома ядовитых желез скорпионов *M. eurus* и *O. scrobiculosus*, выделению и характеристике блокаторов K^+ каналов из цельных ядов скорпионов и созданию нового биомолекулярного инструмента на основе токсинов из яда скорпионов КТх для визуализации K^+ каналов. Во второй части проводится детальное и всестороннее обсуждение приведенных результатов. Подчеркивается важность проведенной актуализации классификации КТх, анализируется использованная стратегия поиска и идентификации КТх, подробно рассматривается возможность применения сконструированного флуоресцентного химерного белка eGFP-OSK1 на практике. Полученные результаты интересны не только с точки зрения фундаментальных исследований, но и имеют явное практическое применение.

Материалы исследования А. И. Кузьменкова логично и последовательно изложены в подготовленной им диссертации и её автореферате. Использованный при обработке экспериментальных данных математический аппарат обеспечивает достоверность интерпретации результатов исследования. Формулируемые выводы обоснованы, логично вытекают из экспериментальных данных, полностью соответствуют целям и задачам

исследования. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения.

Рукопись диссертации оформлена весьма аккуратно и грамотно, замечаний в этом плане не возникает. Единственный вопрос, который возникает при прочтении диссертации А. И. Кузьменкова – это какая часть разработки базы данных Kalium была сделана автором, поскольку упоминается международный характер этой работы и поддержки сервера. Однако это замечание не является сколь либо значительным и не влияет на значимость полученных результатов и обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации.

Результаты работы представлены на более чем десяти российских и международных конференциях; основные положения и выводы опубликованы в пяти статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ. В виде публикаций и докладов представлены все результаты диссертации. Содержание диссертационной работы в полной мере соответствует специальности 02.00.10 - биорганическая химия. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

Диссертация А. И. Кузьменкова по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня и полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении учёных степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335 в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 N 748)," а сам диссертант, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - Биорганическая химия.

Кандидат химических наук,
заместитель директора по науке
Института белка РАН

А. Д. Никулин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук.

Почтовый адрес: Институт белка РАН, ул. Институтская, д.4,
г. Пущино, Московская обл., 142290, Россия.

Телефон: (4967) 318-425.

Адрес электронной почты: nikulina@vega.protnes.ru

Подпись А. Д. Никулина заверяю:
Учёный секретарь ИБ РАН
к.б.н.

11 ноября 2016 г.



Е.Ю. Никонова