

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 14 декабря 2016 г. № 16

О присуждении **Кузьменкову Алексею Игоревичу**, гражданину РФ ученой степени кандидата химических наук. Диссертация «Токсины яда скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Orthochirus scrobiculosus*, действующие на калиевые каналы» по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия принята к защите 12 октября 2016 г, протокол № 12 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) (117997, Российская Федерация, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Кузьменков Алексей Игоревич 1988 года рождения, в 2010 г. окончил очное отделение Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «биохимия», в период подготовки диссертации с 2010 по 2013 гг. являлся аспирантом очной формы обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время работает младшим научным сотрудником в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Диссертация выполнялась в группе молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат химических наук **Василевский Александр Александрович**, руководитель группы молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Семьянов Алексей Васильевич, доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор НИИ Нейронаук Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, руководитель лаборатории внесинаптической передачи,

Никулин Алексей Донатович, кандидат химических наук, заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), Санкт-Петербург, в своем положительном заключении, подписанном заведующим лабораторией биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН, д.б.н., чл.-корр. РАН Тихоновым Д.Б. и утвержденном директором ИЭФБ РАН д.б.н. Фирсовым М.Л., указала, что диссертация соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а ее автор, Алексей Игоревич Кузьменков, заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Соискатель имеет 26 опубликованных работ, из них по теме диссертации - 16 работ, в том числе 5 статей в научных журналах, цитируемых базой данных Web of Science. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной вклад:

1. **Kuzmenkov A.I.**, Nekrasova O.V., Kudryashova K.S., Peigneur S., Tytgat J., Stepanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V., Feofanov A.V., Vassilevski A.A. (2016) Fluorescent protein-scorpion toxin chimera is a convenient molecular tool for studies of potassium channels. *Sci. Rep.* **6**:33314

2. **Kuzmenkov A.I.**, Krylov N.A., Chugunov A.O., Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2016) Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom. *Database (Oxford)*. **2016**, pii: baw056
3. **Kuzmenkov A.I.**, Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2015) Diversity of potassium channel ligands: focus on scorpion toxins. *Biochemistry (Mosc.)*. **80**, 1764–1799
4. **Kuzmenkov A.I.**, Vassilevski A.A., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tytgat J., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V. (2015) Variability of potassium channel blockers in *Mesobuthus eupeus* scorpion venom with focus on Kv1.1: AN INTEGRATED TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC STUDY. *J. Biol. Chem.* **290**, 12195–12209
5. Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., **Kuzmenkov A.I.**, Vassilevski A.A., Ignatova A.A., Korolkova Y.V., Grishin, E. V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. (2013) Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for Kv1.3 ligand screening and study. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 2379–2389

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Официального оппонента д.б.н., чл.-корр. РАН Семьянова А.В., отзыв положительный. Среди замечаний и пожеланий оппонентом было отмечено: 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
2. Официального оппонента к.х.н. Никулина А.Д., отзыв положительный. Среди замечаний и пожеланий оппонентом было отмечено: «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».

3. Ведущей организации, отзыв положительный. При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания: 1). Отмечена не вполне удачная конструкция обзора литературы. 2). Разные части работы не всегда увязаны между собой в тексте диссертации. Однако, данные замечания относятся лишь к тексту диссертационной работы и не умаляют достоверности и значимости полученных результатов.

4. Отзыв на автореферат д.х.н. Байкова Александра Андреевича (руководитель отдела химии белка НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, профессор), отзыв положительный. Обозначены небольшие замечания: 1). Нет расшифровки сокращения $CS\alpha/\beta$. 2). Стоило округлить значения IC_{50} .

5. Отзыв на автореферат д.б.н. Соколовой Ольги Сергеевны (руководитель группы структурной биотехнологии кафедры биоинженерии, биологического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова, профессор РАН, доцент), отзыв положительный. Представлены технические замечания: 1). Очень подробное описание элементов управления базы данных Kalium. 2). Помимо раздела «Благодарности», стоило бы указать в тексте автореферата с кем в сотрудничестве проводились те или иные работы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих теме представленной диссертации. Это подтверждается наличием у них значительного количества публикаций в ведущих российских и международных научных журналах и изданиях. Стоит отметить, что сотрудниками Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова ведутся работы по изучению механизмов мембранного транспорта, а также поиску и характеристике соединений, активных на различные ионные каналы. Научные интересы Семьянова А.В. лежат в области нейробиологии и изучения регуляции ионных каналов. Никулин А.Д. является признанным экспертом в вопросах, связанных с химией полипептидных соединений. Наличие солидного опыта и высокой квалификации в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных

соискателем исследований разработана база данных Kalium (kaliumdb.org), идентифицированы, выделены и охарактеризованы новые полипептидные лиганды калиевых каналов, а на основе одного из лигандов создан новый биомолекулярный инструмент.

Теоретическая значимость исследования состоит в получении новых знаний о лигандах калиевых каналов, проведении исчерпывающего анализа и структуризации имеющихся данных, закладывающих основу для дальнейших исследований лиганд-рецепторных взаимодействий. Кроме того, впервые было показано использование нового биомолекулярного инструмента на основе флуоресцентного белка и токсина скорпиона.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что на основе токсинов могут быть созданы лекарственные препараты для лечения ряда заболеваний: каналопатий, некоторых аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний. Химерные молекулы на основе флуоресцентного белка и токсина могут применяться для визуализации ионных каналов и для скрининговых технологий.

Применительно к проблематике диссертации результативно, с получением обладающих новизной результатов использованы методы молекулярной биологии (ПЦР, клонирование, выделение плазмидной ДНК), биоорганической химии (модификация и секвенирование полипептидов), физико-химические методы анализа (спектрофотометрия, ряд хроматографических методов), а также биоинформатические методы (анализ транскриптомов).

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные работы были проведены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, показана воспроизводимость результатов исследования. Теоретические предположения и концепции, использованные в работе, построены на основе современных опубликованных экспериментальных данных по теме диссертации, а полученные автором результаты с ними согласуются. В ходе выполнения работы были использованы современные методики биоорганической химии, молекулярной биологии и физической химии.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выборе

основных направлений и методов исследования, получении и анализе экспериментальных данных. Соискатель проводил разработку структуры анализ и сбор данных для базы данных Kalium, выделял активные соединения из яда скорпионов, проводил работы по установлению первичной структуры новых молекул, проводил сборку и анализ транскриптомов скорпионов, проводил работу по молекулярному клонированию, получению, очистке и наработке нового биомолекулярного инструмента на основе флуоресцентного белка и токсина. Создание программной оболочки Kalium производилось в сотрудничестве с лабораторией моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН, скрининг активных соединений с помощью флуоресцентной системы на основе сферопластов производился сотрудниками лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН и группы нанобиоинженерии ИБХ РАН. Электрфизиологические измерения проводились сотрудниками лаборатории токсикологии университета г. Лёвен, Бельгия. Работы по визуализации ионных каналов в различных образцах проводились в сотрудничестве с лабораторией лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН и лабораторией биокатализа ИБХ РАН. Автор лично участвовал в апробации результатов работы на конференциях. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проводилась лично соискателем или при его непосредственном участии.

На заседании 14 декабря 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Кузьменкову Алексею Игоревичу ученую степень кандидата химических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук (по специальности 02.00.10 – биорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя диссертационного совета
член-корр. РАН

 Липкин В.М.

Ученый секретарь диссертационного совета
д.ф.-м.н.

 Олейников В.А.

