

О Т З Ы В

Официального оппонента на диссертационную работу Сачковой Марии Юрьевны «Двудоменные токсины ядов пауков», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ: Диссертационная работа Сачковой М.Ю. посвящена изучению достаточно нового и малоисследованного класса токсинов пауков, имеющих двудоменную структуру. Ядовитые животные встречаются на многих ветвях эволюционного дерева. Изучение токсинов, продуцируемых ядовитыми животными, фундаментально интересно для понимания биологии и эволюции. Разнообразие токсинов внутри каждого семейства помогает глубже понять механизмы взаимосвязи структура-функция белковых молекул. Кроме того, нельзя забывать, что многие токсины могут служить прекрасными инструментами в руках исследователя, позволяя проводить изучение функционирования мишеней этих токсинов. Токсины также находят применение в медицине, в качестве селективных средств воздействия на мембранные рецепторы определенных типов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА: Яды животных состоят, в основном, из белков и пептидов. Даже в составе яда одного и того же вида содержится множество сходных пептидов, представляющих собой своеобразную библиотеку токсинов. Обычно, пептидные токсины достаточно короткие и состоят из одного домена. Структура таких доменов содержит как консервативные мотивы, определяющие пространственную укладку, так и переменные аминокислотные остатки. Двудоменные токсины, объединяющие в своей структуре сходные или различные токсичные домены, встречаются достаточно редко. В данной работе впервые описано целое семейство двудоменных токсинов пауков семейства *Oxyopidae*, названных спайдеринами. Эти токсины состоят из «линейного» пептида, взаимодействующего с мембраной и проявляющего бактерицидный эффект, и домена цистинового узла, взаимодействующего, по всей видимости, с кальциевыми каналами. В яде паука *Cheiracanthium punctorium* были обнаружены двудоменные токсины другого строения, содержащие два домена цистинового узла. В работе также было проведено исследование ранее обнаруженного цитоинсектотоксина из яда паука *Lachesana tarabaevi*, состоящего из двух модулей, взаимодействующих с мембраной. Экспериментальные исследования

очень удачно сочетаются в этой диссертационной работе с биоинформатическим анализом и глубоким обсуждением результатов.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ: Диссертационная работа Сачковой М.Ю. представляет несомненный практический интерес. Токсины, в частности уникальные двудоменные токсины, впервые описанные в данной работе могут найти практическое применение. Альфа спиральные домены имеют антимицробную активность и могут, при доработке стать основой новых антибиотиков. В то же время домены токсинов, имеющие укладку цистинового узла, могут найти применение в качестве инструментов исследования нервной системы. Двудоменные токсины имеют сильную инсектицидную активность и могут быть применены в сельском хозяйстве. Таким образом, кроме очевидного интереса для фундаментальной науки, работа Марии Юрьевны имеет высокую практическую значимость.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ: Диссертация Сачковой Марии Юрьевны написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 116 страницах машинописи и содержит 19 рисунков и 14 таблиц. Список цитируемой литературы состоит из 238 источников.

Обзор литературы посвящен строению и эволюции белковых и пептидных токсинов практически всех таксономических групп животных. Приведен подробный анализ типов и вариантов пространственной укладки токсинов. Особенно подробно описано строение токсинов, имеющих структуру цистинового узла, и их молекулярных мишеней. Кроме того, описаны токсины, действующие на мембраны клеток и другие типы токсинов. Для множества ядовитых организмов описано строение генов токсичных пептидов и особенности их эволюции. Конечно, особенный акцент в обзоре литературы делается на двудоменные токсины. Описано, какие таксономические группы организмов имеют подобные пептиды и какие домены входят в состав подобных ядов. Возможное взаиморасположение доменов может различаться, причем не все возможные сочетания были известны до настоящей работы.

Материалы и методы, применяемые в работе описаны со всеми необходимыми подробностями. Нет сомнений в том, что используя соответствующий раздел диссертации можно будет воспроизвести все эксперименты. Более того, поражает разнообразие методов, используемых в работе. Помимо методов многостадийной

очистки токсичных пептидов и их идентификации, Мария Юрьевна использует методы генной инженерии и достаточно любопытные приемы для получения рекомбинантных токсинов в клетках *E. coli*. Проблемой в этом служит антимикробное действие токсинов OtTx 1a и его фрагмента OtTx 1a-AMP. Если для последнего был возможен химический синтез, то полноразмерный токсин необходимо было получать, экспрессируя его ген в бактериальной системе. Для снижения токсичности при экспрессии и облегчения сворачивания третичной структуры этого белка, белок получали в виде гибрида с тиоредоксином и природным пропептидом из белкового предшественника OtTx 1a. Как предполагается, пропептидный участок ингибирует токсичность OtTx 1a при его биосинтезе в организме паука. Сходным образом токсичность OtTx 1a была снижена при его гетерологичной экспрессии. Для отщепления пропептида, а вместе с ним и довесков, использовавшихся для сворачивания токсина и его аффинного выделения, применялся оригинальный, изящный метод. В последовательности зрелой формы OtTx 1a нет остатков метионина. Один такой остаток был введен в белковую последовательность рекомбинантного токсина, как раз между пропептидом и участком, соответствующем зрелой форме. После выделения гибридного белка, Мария Юрьевна расщепляла белковую цепь по остатку метионина с помощью бромциана. Жаль, что такой изящный метод нельзя применять для получения более длинных белков, которые обычно содержат остатки метионина.

В диссертационной работе разделены разделы Результаты и Обсуждение. Это очень хорошая практика, поскольку часто, в других диссертациях, слияние этих разделов в один приводит к недостаточно подробному обсуждению результатов, полученных соискателем. Раздел Результаты начинается описанием выделения в чистом виде активных компонентов из цельного яда *O. takobius*. Для этого применяется многоступенчатая хроматографическая очистка, начинающаяся с гель-фильтрации и заканчивающаяся обратно-фазовой ВЭЖХ. N-концевые части токсинов были определены с помощью белкового секвенирования по Эдману, а затем последовательности полноразмерных токсинов были найдены в продуктах *in silico* трансляции библиотеки кДНК из ядовитых желез изучаемого паука. Кроме тех токсинов, которые были очищены в виде полипептидов, в транслированных последовательностях кДНК из ядовитых желез пауков рода *Oxyopes* были найдены последовательности еще 15 новых токсинов, родственных выделенным. Более того, после определения последовательностей кДНК, была проведена амплификация соответствующих геномных фрагментов и определено, что гены токсинов являются

безинтронными. Необычным в структуре OtTx 1a была его двудоменная структура. N-концевая часть токсина представлена антимикробным пептидом, а C-концевая токсином, имеющим структуру цистинового узла. Полноразмерный токсин OtTx 1a и отдельно его N- и C-концевые домены были получены в чистом виде. Для получения относительно короткого N-концевого домена возможно было использовать химический синтез, а вот полноразмерный токсин и C-концевой домен пришлось получать с помощью экспрессии в *E. coli*. C-концевой домен не проявлял антибактериальной активности, поэтому экспрессия его гена не составляла трудностей. Единственной проблемой было замыкание дисульфидных связей, но и она была решена с помощью длительной инкубации в аэробных условиях. Для получения рекомбинатного полноразмерного токсина была использована очень элегантная уловка, про которую я уже писал.

После выделения в чистом виде был проведен анализ вторичной структуры с помощью кругового дихроизма. В соответствии с ожиданиями, оказалось, что N-концевой домен складывается в альфа спираль в окружении, имитирующем мембрану. Модель этой спирали говорит о наличии кластеров гидрофобных и положительно заряженных аминокислот, что очень характерно для антимикробных пептидов. Проверка антимикробной активности, флюоресцентная микроскопия и взаимодействие с липосомами подтвердила предположения о функции N-концевого домена.

Помимо спайдеринов пауков рода *Oxyopes* в работе исследованы гены двудоменных токсинов паука *C. punctorium*. В отличие от спайдеринов, в состав этих токсинов входят два домена цистиновых узлов. В составе яда паука *L. tarabaevi* двудоменные токсины, наоборот, содержат тандем антимикробных пептидов. N- и C-концевые домены токсина C1T 1a были получены химическим синтезом. Их антимикробная активность была изучена экспериментально.

Очень интересно читается раздел обсуждение результатов. Видно, что Мария Юрьевна хорошо продумала свои результаты и сделала интереснейшие выводы об эволюции двудоменных токсинов пауков. Так, проведены аналогии между модульными токсинами скорпионов и изученными в данной работе токсинами, названными спайдеринами. По-видимому, мы имеем дело с конвергентной эволюцией. Интересны размышления о синэргичном действии двудоменных токсинов, сочетающих мембран-связывающий домен и домен цистинового узла, а также два сходных домена в одной последовательности.

Больше всего мне понравились размышления об эволюции двудоменных токсинов. Так, токсины *Oxyopes*, состоящие из АМР и ИСК доменов, могли появиться в результате потери интрона из предкового гена. В то время, как домен цистинового узла похож на однодоменные токсины пауков, N-концевой домен не имеет гомологов. Однако, в составе участка, кодирующего этот домен, имеется донорный участок сплайсинга. Автор диссертационной работы предполагает, что это указывает на возможное происхождение этой последовательности из интронной. Это разумная и интересная гипотеза. В отличие от происхождения двудоменных токсинов *Oxyopes*, токсины *C. punctorium*, содержащие два ИСК домена, скорее всего произошли в результате слияния предковых генов. У родственного паука *L. singoriensis* гены, сходные с генами N- и С-концевых доменов CrTx, разделены.

Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, а ее результаты стали основой для вдумчивого размышления и обоснованных выводов.

Только по долгу оппонента мне необходимо указать какие-то недостатки в данной работе.

1. Конечно, в рамках одной диссертационной работы нельзя сделать все интересные опыты, тем более, что экспериментального материала более чем хватает для кандидатской диссертации. Тем не менее, диссертационная работа сильно выиграла бы, если бы не только активность по разрушению мембраны, но и активность по отношению к ионным каналам была бы продемонстрирована для изучаемых токсинов. Тогда более обоснованными были бы выводы о синергизме в работе доменов, входящих в состав одного токсина.
2. МИК доменов С1Т1а измерена в работе, а данные о токсичности полноразмерного токсина цитированы по работе, правда своей же лаборатории. Для корректного сравнения было бы лучше сравнивать МИК в одном эксперименте.
3. Имея яд паука *O. takobius* и зная массы токсинов по данным *in silico* трансляции библиотеки кДНК, можно было бы попробовать определить содержание токсинов, которые не были выделены в чистом виде, в яде. Было бы интересно узнать, какие компоненты паучьего яда являются основными, а какие второстепенными.

Хочу отметить, что указанные недостатки не затрагивают высокой научной значимости полученных результатов и нисколько не снижают общего прекрасного впечатления от этой замечательной научной работы.

Всё вышеперечисленное позволяет заключить, что работа Сачковой М.Ю. «Двудоменные токсины ядов пауков», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» является самостоятельным законченным научным исследованием. Автор полностью справилась с поставленной научной задачей, приведенные в диссертации выводы соответствуют полученным экспериментальным данным и являются важным для биоорганической химии результатом. Автореферат соответствует диссертации. По уровню научных исследований и значимости 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».

Профессор кафедры Химии Природных Соединений
Химического факультета Московского Государственного
Университета имени М.В. Ломоносова, д.х.н.

Сергиев П.В.

Подпись проф. Сергиева П.В.
заверяю.

декан хим. ф-та

