

## ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Марии Юрьевны Сачковой

«Двудоменные токсины ядов пауков»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 «Биоорганическая химия».

Диссертационная работа Марии Юрьевны Сачковой посвящена выделению и характеристике пептидных двудоменных токсинов из ядов пауков *Oxyopes takobius* и *Oxyopes lineatus*, *Cheiracanthium punctorium*, *Lachesana tarabaevi*. Целью такого описания является расширение научного знания о разнообразии животных токсинов, и, в частности, двудоменных токсинов пауков.

### Содержание диссертации.

Диссертационная работа М.Ю. Сачковой имеет традиционную структуру. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в работе, результатов, их обсуждения, выводов, списка литературы и благодарностей. Литературный обзор посвящен непосредственно предмету исследования: подробно описаны известные пептидные токсины из ядов пауков с акцентом на их структуру, а также организация известных генов токсинов пауков и других ядовитых животных. Кроме того, приводятся сведения о молекулярных механизмах эволюции описанных генов токсинов. Раздел “Материалы и методы” подробно описывает экспериментальные методы, использованные в работе. К сожалению, вычислительные методы, а именно методы биоинформатики и анализа нуклеотидных последовательностей, на мой взгляд освещены недостаточно подробно для возможности воспроизведения результатов диссертационной работы. Затем описаны результаты исследования. Отдельная глава посвящена их обсуждению – результаты работы помещены в контекст накопленных к моменту начала исследования данных по данному

направлению, проведен анализ источников трудностей, возникших в процессе исследования. Выводы диссертации, включающие пять пунктов, полностью соответствуют описанным в работе результатам. Список литературы состоит из 238 ссылок, присутствуют работы 2013 и 2014 годов. Представленная диссертационная работа является законченным научно-исследовательским трудом и свидетельствует о высоком квалификационном уровне М.Ю. Сачковой.

#### **Актуальность темы диссертации.**

Диссертация посвящена относительно мало изученной ранее теме – двудоменным пептидным ядам пауков. Интерес к разнообразию токсинов ядов продиктован как несомненной важностью последних для эволюции пауков, так и их функциональным спектром, позволяющим рассматривать их в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

#### **Новизна результатов и выводов диссертации.**

В диссертации М.Ю. Сачковой был описан целый ряд новых пептидных токсинов ядов пауков, в частности, выделен новый структурный класс двудоменных токсинов, состоящих из линейного домена в качестве N-концевого и ноттинового домена на C-конце. Такие токсины представлены в яде пауков рода *Oxyopes*. Они были названы спайдеринами. Подробно охарактеризованы их цитолитическая, антимикробная и инсектицидная активности.

Новые токсины с инсектицидной активностью, включающие два ноттиновых модуля, описаны в яде паука *Cheiracanthium punctorium*. Была также исследована активность линейных модулей цитоинсектотоксина 1a из яда паука *Lachesana tarabaevi* и показан их синергизм.

Для большинства изученных токсинов были найдены кодирующие их гены, описана их структура и проанализированы эволюционные механизмы, ответственные за их изменчивость.



## **Ценность для науки и практики. Практическая значимость обсуждаемой работы.**

Как уже упоминалось, в обсуждаемой работе найдены новые токсины, обладающие высокой антимикробной активностью, что делает их привлекательным объектом для дальнейших фармакологических исследований. Кроме того, все изученные токсины обладают инсектицидной активностью, что также может быть использовано в соответствующих прикладных задачах. Для спайделинов даже был преодолен следующий этап на пути к их практическому использованию: разработана система для их гетерологической экспрессии.

Оценивая диссертацию в целом, прежде всего, хочется отметить четко разработанную методологию характеристики отдельных двудоменных токсинов, оказавшуюся эффективной в исследованиях ядов всех пауков, выбранных в качестве объекта данной работы. Текст диссертации поражает очень аккуратным оформлением и грамотным изложением материала. Стоит отметить также очень насыщенный информацией обзор литературы, полно отражающий современное состояние исследования в области изучения токсинов пауков и предоставляющий всю необходимую вводную информацию по теме исследования.

Однако стоит высказать и несколько замечаний по обсуждаемой диссертационной работе. Большинство из них относятся к разделу эволюционного анализа последовательностей генов, кодирующих изучаемые токсины.

- 1) Как уже упоминалось в описании структуры диссертации, недостаточно подробно описаны вычислительные методы исследования, использованные в диссертации: для большинства программ не описаны использованные значения параметров, часто не детализированы методы, реализованные в составе упомянутых пакетов

программ и использованные для конкретного анализа. Кроме того, в общем изложении результатов не всегда понятно, какой конкретно анализ привел к соответствующему утверждению. Например, на странице 63 полного текста диссертации (странице 6 автореферата) упоминается, что “домен, согласно расчетам, проявляет склонность к формированию альфа-спирали”: какие расчеты имелись в виду, в тексте не поясняется и это не следует из контекста изложения.

2) Больше всего нареканий вызывают однотипные подписи к таблицам 7 и 12 в тексте диссертации (таблицы 2 и 6 автореферата):

а. Названы они как “Результаты Z-теста на отрицательные отбор”.

Z-тест не является общепринятым тестом на отрицательный отбор, он не описан подробно в Методах, ссылка на изложение теста также отсутствует в диссертации, а из таблиц неясно, в чем он состоит. Кроме того, содержание таблиц не укладывается в рамки результатов теста на отрицательный отбор – таблицы содержат значения распространенных эволюционных параметров. Исходя из списка упомянутых параметров, по-видимому, вывод о характере действующего отбора делается на основе сопоставления частот синонимичных и несинонимичных мутаций, но ни значения частот, ни обычно используемое отношение частот в таблицах не приведены, а приведена их разность. Как при этом вычислены р-значения, остается непонятным;

б. В легенде упомянуто, что “р – вероятность того, что нулевая гипотеза о нейтральности ( $d_N = d_S$ ) будет отвергнута в пользу альтернативной гипотезы ( $d_N < d_S$ )”. Судя по тому, что выводы считали значимыми при значениях величины р, меньших общепринятого уровня значимости в 5%, в качестве величины р использовали стандартный статистический параметр р-value (или р-значение), который, по определению, характеризует вовсе не



“вероятность того, что нулевая гипотеза будет отвергнута”, а вероятность наблюдать реально зафиксированные или более экстремальные значения при условии нулевой гипотезы.

- 3) Если в обсуждении тестов на положительный отбор упоминается поправка на множественные тестирования (или поправка Бонферрони), то результаты тестов на отрицательный отбор свидетельствуют о том, что в этих случаях ее не учитывали, хотя она также должна быть учтена (и, соответственно, не все тесты, приведенные в диссертации, останутся значимыми после ее учета).
- 4) При применении тестов отношения правдоподобия указаны, но не описаны использованные модели эволюции отдельных позиций в белковых последовательностях и не мотивирован выбор использованных моделей среди всех возможных.
- 5) По всему тексту диссертации метод построения деревьев назван “методом ближайшего соседа”. Это неверный перевод названия метода: “методом ближайшего соседа” обычно называют очень часто используемый метод классификации объектов (и большое количество его модификаций) или аналогичный по логике метод аппроксимации. Метод же построения филогенетических деревьев не имеет ничего общего с упомянутыми вычислительными методами, и правильно его называть точным переводом английского названия, то есть “методом объединения соседей”.
- 6) Для иллюстрации разделения на семейства последовательностей кДНК СрТх токсинов приведено их филогенетическое дерево (рисунок 15 теста диссертации и рисунок 11 автореферата). Однако в тексте указано, что эти последовательности несут единичные различия. Для таких данных филогенетические деревья не являются удобным и правильным средством анализа или иллюстрации различий (что и видно на соответствующих рисунках), так как филогенетический анализ не оперирует единичными событиями. Правильно было бы

иллюстрировать такое разделение множественными выравниваниями и/или матрицами попарных расстояний между последовательностями, например, в числе замен.

- 7) На стр. 72 текста диссертации (стр. 11 автореферата) сказано, что “Подавляющее большинство пар N-концевых доменов подвергается отрицательному отбору”. Действительно, тесты на характер отбора основаны на сравнении пар гомологичных последовательностей, но отбор действует не на пары, а на одного или обоих обсуждаемых гомологов при эволюции от общего предка этих гомологов до точки наблюдения, поэтому правильнее было бы сказать, что, например, “Большинство N-концевых доменов подвергается отрицательному отбору”.
- 8) При анализе вторичной структуры линейных пептидов в разных условиях интересно было бы сравнить приведенные результаты о долях последовательностей, находящихся в составе тех или иных элементов вторичной структуры, с предсказанными вторичными структурами этих последовательностей. Программ, делающих такие предсказания, существует огромное количество (например, PsiPRED) и, хотя достоверность таких предсказаний не 100%, информативность результатов предсказаний выше, чем расшифровки спектров кругового дихроизма, так как они предсказывают непосредственно элементы вторичной структуры и их положения в последовательности, а не только их долю.
- 9) При обсуждении последовательностей кДНК, соответствующих различным СрТх токсинам и различающихся единичными заменами, предполагается, что они являются транскриптами дублированных генов, но не обсуждается более очевидное в общем случае предположение, что они представляют индивидуальные варианты одного и того же гена в экспериментальной пробе, а их различия – точечные полиморфизмы.



- 10) Для иллюстрации положения RQM в множественных выравниваниях использован курсив и звездочки под последовательностями. Это неудачное обозначение, так как звездочками под столбцами выравнивания общепринято обозначают консервативные позиции.
- 11) В тексте неоднократно использованы выражения “последовательности высокомологичны” или “последовательности идентичны на N%”. Это некорректно, так как термины “гомологичные” или “идентичные” являются относительными прилагательными, и не могут проявляться в большей или меньшей степени: правильно говорить “последовательности гомологичны и характеризуются высоким уровнем сходства” и “последовательности сходны при уровне идентичности N%” или, проще, “N% остатков последовательностей совпадают”.
- 12) В пятом пункте раздела Выводы фигурирует предложение: “Предположено, что в ходе эволюции гены модульных токсинов образовались из генов однодоменных токсинов”. Это только предположение, высказанное, но доказанное в данной работе, поэтому оно не может служить выводом из результатов исследования.

Большинство высказанных замечаний, однако, редакционные, но и остальные не носят принципиального характера. Они не снижают несомненно высокой научной значимости полученных результатов работы.

Содержание автореферата и опубликованных автором оригинальных работ полностью отражает основные положения диссертации. Выводы, в большинстве своем, конкретны, обоснованы приведенными результатами и не вызывают сомнений. В целом, диссертационная работа “Двудоменные токсины ядов пауков” безусловно является важным и оригинальным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне.

Таким образом, 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.

С.н.с., зав. группой биоинформатики  
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН  
кандидат биологических наук

И.И. Артамонова

**«Подпись И.И. Артамоновой заверяю»**

Ученый секретарь ИОГен РАН  
доктор биологических наук



О.А. Огаркова

11 июня 2014 года