

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
Волынцевой Алены Дмитриевны
на тему «Молекулярное моделирование структурной динамики потенциал-
управляемых калиевых каналов K_v1 и их комплексов с пептидными
блокаторами» по специальности 03.01.02 – «Биофизика»

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Волынцевой Алены Дмитриевны посвящена изучению структурной организации потенциал-управляемых калиевых каналов семейства K_v1 , а также их комплексов с токсинами – поровыми блокаторами, выделенными из яда скорпионов. Потенциал-управляемые калиевые каналы представляют собой трансмембранные белки, контролирующие перенос ионов K^+ через клеточную мембрану в ответ на изменение мембранного потенциала. Эти каналы широко распространены в организме человека и выполняют разнообразные физиологические функции и рассматриваются в качестве перспективных мишеней для лечения дисфункций сердечно-сосудистой, нервной и нервно-мышечной систем организма, а так же аутоиммунных заболеваний.

Тематика работы связана с решением нескольких актуальных научных проблем современной биофизики и молекулярной биологии, – пониманием механизмов работы калиевых каналов и механизмов лиганд-рецепторных взаимодействий (аффинности и селективности связывания) на уровне пространственной структуры. Кроме того работа актуальна и с практической точки зрения. Решение задач поставленных в диссертации, позволяет применять новые прикладные подходы для создания высокоэффективных лекарственных средств, направленных на терапию заболеваний, связанных с нарушениями функционирования калиевых каналов.

Общая характеристика диссертационной работы

Представленная диссертационная работа Волынцевой А.Д. изложена на 163 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора,

материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка публикаций по теме диссертации и списка цитируемой литературы, состоящего из 344 наименований. Работа содержит 38 рисунков и 10 таблиц.

Во **введении** сформулированы цели и задачи исследования, обоснована актуальность, новизна и практическая значимость работы.

В **Литературном обзоре** приведена информация о классификации калиевых каналов и, действующих на них, пептидных токсинов. Приведены имеющиеся экспериментальные данные о пространственной структуре, механизме функционирования и физиологической роли потенциал-управляемых калиевых каналов и их пептидных блокаторов, а также образуемых ими комплексов. Подробно освещены современные исследования терапевтического потенциала применения пептидных блокаторов в лечении болезней человека. В обзоре уделено внимание вопросам применения современных методов молекулярного моделирования для исследования калиевых каналов и их комплексов с лигандами, а также для проведения расчетов энергии связывания каналов с блокаторами.

В разделе **Материалы и методы** описаны используемые методы молекулярного моделирования и анализа полученных данных. Дается описание методики компьютерного моделирования, включающей моделирование порового домена калиевых каналов с пептидными блокаторами по шаблону известной структуры комплекса гомологичного токсина и канала, молекулярную динамику системы в водно-ионном окружении, отбор предпочтительной ориентации блокатора в сайте связывания целевого канала и анализ всех образующихся взаимодействий, а также расчета энергии связывания токсинов с K_v1 каналами методом потенциала средней силы.

Раздел **Результаты и обсуждение** включает результаты исследования динамики калиевых каналов $K_v1.X$ (где $X = 1, 3, 6$) млекопитающих и гибридных каналов $KcsA-K_v1.X$, на основе бактериального белка $KcsA$, трех пептидных блокаторов – токсинов из ядов скорпионов (аджитоксин 2, калиотоксин и токсин OSK1), а также их комплексов. Несмотря на общую гомологию пространственной организации, эти токсины имеют разную селективность взаимодействия по

отношению к разным каналам $K_v1.X$. Описаны структурные особенности комплексов, приведена классификация межмолекулярных контактов по типам взаимодействий, на уровне отдельных остатков. На интерфейсах связывания выделены консервативные и переменные остатки, проведена относительная оценка силы контактов на основе их стабильности в процессе молекулярной динамики.

В результате работы, впервые детально описаны интерфейсы связывания поровых доменов каналов $K_v1.1$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$ с токсинами скорпионов, а также выявлены факторы, ответственные за различия в аффинности взаимодействия токсинов с различными каналами, на уровне отдельных остатков и функциональных групп. На основе проведенного анализа интерфейсов предложены мутантные формы аджитоксина 2 (R31G и H34K) обладающие сниженной и повышенной, соответственно, аффинностью к каналу $K_v1.1$, по сравнению с токсином дикого типа. Методом потенциала средней силы рассчитаны свободные энергии образования соответствующих комплексов. Рассчитанные энергии качественно согласуются с результатами экспериментальных измерений констант диссоциации комплексов *in vitro*.

Новизна и значимость проведенных исследований и полученных результатов

Все результаты получены Волынцевой А.Д. впервые, являются оригинальными и значимыми с точки зрения биофизики, молекулярной и структурной биологии. Результаты работы имеют значимость для дальнейших фундаментальных исследований основ функционирования калиевых каналов и процессов связывания высокомолекулярных соединений и, в частности, изучения структурных основ аффинности и селективности пептидных лигандов с белками мишенями.

Практическая значимость работы заключается в разработке нового подхода позволяющего, сравнительно быстро моделировать структуры комплексов каналов с пептидными блокаторами, а также предлагать и предварительно валидировать модификации блокаторов, меняющие их селективность. Данные о пространственной структуре комплексов канал-блокатор, а также новые методы моделирования, необходимы для создания новых лекарственных препаратов. Результаты работы также могут быть использованы в учебном процессе.

Представленная диссертационная работа выполнена на высоком уровне. В качестве недостатков, несколько не подвергающих сомнению основные результаты и выводы работы, я бы указал следующие.

1. В части литературного обзора, описывающей различные семейства токсинов животных, действующих на калиевые каналы, приведена устаревшая классификация спиральных токсинов. Так согласно современным данным токсины анемон BgK и ShK относятся к одному структурному типу (так называемый ShK-мотив), включающему множество различных молекул из морских беспозвоночных, а также отдельные домены более крупных белков позвоночных животных и млекопитающих.
2. С методической точки зрения, использование вышеупомянутого комплекса в качестве основного шаблона вызывает ряд вопросов. Из-за усреднения четырех различных ориентаций токсина в кристаллической ячейке, этот комплекс имеет чрезвычайно низкое разрешение в области контакта токсин-канал. Конформационная гетерогенность субъединиц канала не разрешается, а ключевой остаток Lys токсина, блокирующий селективный фильтр канала, не наблюдается на картах электронной плотности. В этом случае следовало больше опираться на данные других методов, например спектроскопии ЯМР. Одна из таких работ, описывающая структуру комплекса мутантного варианта KcsA с харибдотоксином подробно описана в литературном обзоре. Однако другие подобные исследования не упомянуты. Например, в работе (Takeuchi et. al., Structure, 2003) была исследована структура комплекса KcsA с аджитоксином. Было бы уместно хотя бы качественное сравнение экспериментальных данных ЯМР с результатами моделирования, полученными в диссертационной работе.
3. Молекулярное моделирование систем каналов с блокаторами проведено в водной среде и для поддержания структуры трансмембранных сегментов использовался подход, основанный на фиксации координат атомов в соответствующих областях канала. Тем не менее, липиды необычайно важны для функционирования калиевых каналов, например, прочно связанные

липидные молекулы ранее наблюдались в кристаллической структуре химерного канала Kv1.2/2.1, а также описаны для канала KcsA. Необходима мотивировка выбора именно этого протокола моделирования.

4. На стр. 134 работы приводится довольно «путаное» описание результатов вычислений свободной энергии формирования комплексов аджитоксин/Kv1.1. Так использованное выражение «уменьшение энергии связывания» обозначает не уменьшение стабильности комплекса, а наоборот ее увеличение. Под словом энергия автор, видимо, подразумевал свободную энергию образования комплекса, которая имеет отрицательные значения для стабильных комплексов.

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не могут существенным образом повлиять на общую, положительную оценку работы.

Суммируя сказанное, можно заключить, что диссертация Волынцевой А.Д. является актуальным и законченным научно-квалифицированным исследованием, выполненном на высоком научном уровне. Полученные в диссертации основные результаты и сформулированные выводы соответствуют положениям, выносимым на защиту, и не вызывают сомнений в их достоверности. Автореферат диссертации адекватно и полно отражает содержание диссертационной работы. Основные результаты диссертационной работы прошли успешную апробацию на Российских и международных конференциях. Результаты представлены в 17 публикациях, из которых три – это статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК.

Диссертационная работа Волынцевой Алены Дмитриевны отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.02 – «Биофизика» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Волынцева Алена Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Официальный оппонент:

Доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник, руководитель
группы структурной биологии ионных каналов
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»
ШЕНКАРЕВ Захар Олегович

Контактные данные:

Тел. +7 (903) 717-62-78, e-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.01.02 – Биофизика

Адрес места работы:

117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
Тел. +7 (495) 335-01-00, e-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru

Шенкар 18.10.2019

Подпись сотрудника организации

3. О. Шенкарева удостоверяю

В. А. Олейников ДФМН
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ИБХ РАН

