

**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**

Диссертация Волынцевой А.Д. посвящена разработке подходов молекулярного моделирования для изучения структурных особенностей образования межмолекулярных контактов в комплексах потенциал-управляемых калиевых каналов семейства  $K_v1$  с пептидными блокаторами семейства  $\alpha$ -КТх. В настоящее время мало работ, посвященных разработке алгоритмов оценки условий формирования аффинности и селективности при связывании токсина и канала. В связи с этим автор исследовал молекулярные механизмы взаимодействий порового домена потенциал-управляемого калиевого канала  $K_v1$  или его комплекса с пептидными блокаторами семейства  $\alpha$ -КТх. Для достижения указанной цели были сформулированы конкретные задачи, связанные с разработкой моделей калиевого канала  $K_v1$ , гибридного канала KcsA- $K_v1$  и их комплексов с пептидными блокаторами, а также проведен анализ структурных особенностей блокаторов и канала при взаимодействии модифицированных пептидных блокаторов с каналом.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений**

Диссертация Волынцевой А.Д. изложена на 163 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список публикаций по теме диссертации и список литературы, состоящий из 344

наименований. Работа содержит 40 рисунков и 10 таблиц. В обширном **обзоре литературы** диссертации представлена классификация данных о пространственной структуре, механизме действия калиевых каналов и блокаторов, а также их комплексов. В обзоре дается исчерпывающий анализ использования современных методов молекулярного моделирования для реализации задачи диссертации. В главе **Материалы и методы** подробно описаны вычислительные методы моделирования структур потенциал-управляемых калиевых каналов семейства  $K_v1$  и пептидных блокаторов. В главе **Результаты и обсуждение** подробно изложены результаты моделирования структур нативных каналов  $K_v1$  и гибридных каналов  $KcsA-K_v1$ , структур пептидных блокаторов и комплексов калиевых калиевых каналов с пептидными блокаторами, характеристики локального распределения аминокислот в белках при связывания аджитоксина 2 с каналом  $KcsA-K_v1.3$ , а также представлен анализ структур комплексов каналов  $K_v1.6$  и  $KcsA-K_v1.6$  при связывании нативной и мутантных форм аджитоксина 2 с каналом  $KcsA-K_v1.1$ .

### **Новизна проведенных исследований и полученных результатов**

В диссертации Волынцевой А.Д. с использованием моделирования по гомологии по шаблону кристаллографической структуры комплекса гибридного канала  $K_v1.2-2.1$  с харибдотоксином (ChTx) впервые исследованы структуры комплексов калиевых каналов  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$  и  $K_v1.6$  с пептидными блокаторами семейства  $\alpha$ -КТх. Автором доказано, что разработанный подход позволяет выявить механизмы подстройки структуры молекулы токсина и канала в процессе формирования комплекса и, таким образом, предсказать изменения аффинности блокаторов после их мутации.

Считаю, что одним из достижений диссертации Волынцевой А.Д. является детальное и четкое описание молекулярного механизма связывания калиевых каналов  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$  и  $K_v1.6$  с пептидными блокаторами из яда скорпиона. Автор впервые дает детальное описание и классификацию молекулярного взаимодействия белков, учитывая их тип и стабильность, а

также важные для формирования комплексов аминокислотные остатки белков канала и токсина. Анализ позволил Волынцевой А.Д. выявить консервативные и переменные контакты в ряду комплексов пептидов с каналами  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$  и  $K_v1.6$ , отвечающие за аффинность и специфику связывания близких по структуре блокаторов.

В работе Волынцевой А.Д. доказана воспроизводимость образующихся контактов в комплексах токсинов семейства  $\alpha$ -КТх с нативными  $K_v1.X$  и гибридными каналами  $K_{csA-K_v1.X}$  ( $X=1, 3, 6$ ), что важно для анализа механизма связывания блокатора с помощью модельных систем гибридных каналов. Апробированный автором алгоритм расчета энергии связывания позволил выявить различия в связывании пептидных блокаторов с калиевыми каналами  $K_v1.1$ ,  $K_v1.3$  и  $K_v1.6$ , которые документированы некоторыми экспериментальными данными. Очевидно, этот подход можно использовать в качестве метода предварительной оценки перед проведением экспериментов *in silico* и *in vitro*.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Результаты работы Волынцевой А.Д. представляют практическую значимость для дальнейших фундаментальных научных исследований основ функционирования калиевых каналов и процессов связывания высокомолекулярных соединений и, в частности, изучения структурных основ аффинности и селективности пептидных блокаторов при взаимодействии с каналами. Конструирование селективных блокаторов на основе проведенного детального анализа механизма связывания с калиевыми каналами важно для биоинженерии и разработки лекарственных средств на основе мутантных форм пептидных блокаторов или молекулярных биосенсоров *in vivo*. Все это важно как для современной молекулярной физиологии и биофизики, так и для формирования методологии направленной терапии заболеваний, связанных с изменением числа калиевых каналов. Разработанный Волынцевой А.Д. алгоритм может быть использован при моделировании формирования комплексов других каналов с

пептидными лигандами. Очевидно, что особенности строения высокомолекулярных комплексов должны использоваться в учебных курсах по биофизике и физиологии человека и животных.

### **Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики**

Отмечу, что в диссертации Волинцевой А.Д. проведена детальная разработка эффективных способов построения структур биологических макромолекул и их комплексов с лигандами, что важно для исследования механизмов функционирования канала и клетки, а также для решения прикладных задач. Предложенный Волинцевой А.Д. алгоритм, включающий моделирование порового домена калиевых каналов с пептидными блокаторами по гомологии, молекулярную динамику и выбор ориентации блокатора в сайте связывания канала, позволил впервые выявить особенности структурной организации каналов  $K_v1.X$  ( $X=1, 3, 6$ ), KcsA- $K_v1.X$  ( $X=1, 3, 6$ ) и их комплексов с токсинами скорпиона. Проведенный автором анализ общей организации комплексов каналов KcsA- $K_v1.X$  ( $X=1, 3, 6$ ) с пептидными блокаторами доказал высокую консервативность структуры, а также стабильность образующихся комплексов. Важной особенностью сформировавшегося комплекса является специфический поворот токсина в сайте связывания канала и локальная подстройка Р-петель канала, а также участие аминокислотных остатков блокатора, локализованные на плато, образованном  $\beta$ -листом.

Результаты проведенных Волинцевой А.Д. исследований на мутантных формах токсинов могут использоваться как для фундаментального изучения структурных основ взаимодействий в комплексах макромолекул, так и для разработки детектирующих систем и высокоэффективных лекарственных средств для терапии аутоиммунных и невропатических заболеваний.

## **Замечания по диссертационной работе в целом**

В целом, диссертационная работа Волынцевой А.Д. производит хорошее впечатление динамического исследования. В качестве некоторых замечаний отмечу следующее:

1. В разделе о научной новизне диссертационной работы рассматривается возможность использования разработанного алгоритма для комплексов других калиевых каналов с пептидными лигандами. Были ли проведены такие исследования?
2. Литературный обзор занимает 65 страниц, составляя чуть более одной трети от всей диссертации, что представляется несколько избыточным. В частности, широко обсуждается разнообразие пептидных блокаторов (их структуры, связывание с каналами, медицинские аспекты), в то время как в экспериментальной части работы изучается взаимодействие с каналами лишь блокаторов из ядов скорпионов. Кроме того, подробное описание метода моделирования броуновской динамики, который практически не используется в настоящее время, едва ли является оправданным, в то время как методам расчёта энергии связывания с помощью моделирования молекулярной динамики уделено, на мой взгляд, недостаточно внимания, хотя эти методы являются основным рабочим инструментом автора.
3. Остается неясным, как определяется расположение ионов калия в селективном фильтре каналов при рентгеноструктурном анализе, а также принцип выбора и роль положения ионов калия при молекулярном моделировании структур каналов с блокаторами.
4. Неясно, как был рассчитан суммарный теоретический заряд каналов и токсинов, на основе которых было сделано предположение о механизме распознавания токсинами KV1 каналов на плазматической мембране.


Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования и не влияют на главные результаты работы. Действительно, Волынцевой А.Д. выполнен детальный анализ известных и собственных данных, сформулирована модель потенциал-управляемых

калиевых каналов, пептидных блокаторов и их комплексов, проведена оценка энергии связывания каналов с блокаторами. По материалам диссертации опубликовано 7 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 17 тезисов в сборниках научных конференций.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертация Волынцевой Алены Дмитриевны отвечает 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:  
Максимов Георгий Владимирович  
профессор, доктор биологических наук,  
профессор кафедры биофизики  
биологического факультета  
Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования  
«Московский государственный университет  
имени М.В.Ломоносова»

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-19-66, e-mail: gmaksimov@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

03.01.02 – Биофизика

Адрес места работы:

119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Московский государственный университет  
имени М.В.Ломоносова», биологический факультет

Тел.: +7 (495) 939-19-66, e-mail: gmaksimov@mail.ru

Подпись Г.В. Максимова ЗАВЕРЯЮ

