

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Беркут Антонины Анатольевны
на тему: «Молекулярные основы взаимодействия нейротоксинов
паукообразных с потенциал-чувствительными натриевыми каналами»
по специальности 03.01.02 – «Биофизика»

Общая характеристика работы

Диссертационная работа А.А. Беркут посвящена изучению молекулярного механизма взаимодействия двух групп нейротоксинов паукообразных с потенциал-чувствительными натриевыми каналами (Na_v). Работа изложена она на 120 машинописных страницах, содержит 30 рисунков и 15 таблиц, имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы, включающий 353 источника.

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

В **литературном обзоре** подробно описана структурная организация Na_v , механизм их функционирования, заболевания, сопряженные с нарушениями работы (дисфункциями) Na_v , а также детально описаны 8 рецепторных сайтов канала и лиганды, действующие на них.

Раздел **«Материалы и методы»** описывает методы, использованные для достижения поставленной цели. Разнообразие методов свидетельствует о комплексном подходе диссертанта к решению поставленных задач и высоком уровне профессиональных навыков. Особо стоит отметить разнообразие электрофизиологических методов, использованных в работе.

Раздел **«Результаты и обсуждение»** логически разделен на 2 части по числу объектов, которым посвящено исследование. Первая часть раздела посвящена группе α -токсинов скорпионов, которые действуют на рецепторный сайт 3 Na_v и ингибируют инактивацию каналов. Здесь в фокус

исследования попадали физико-химические свойства этих токсинов, лежащие в основе их таксономической селективности. Автор выделяет в структуре полипептидов 2 модуля (сердцевину и модуль специфичности), которые отличаются по своим свойствам (гидрофобности и подвижности) у разных групп α -токсинов скорпионов, а также использует данную информацию для предсказания свойств неизученных токсинов и создания полипептидов с заданным профилем селективности. Также результаты исследования подсказывают характер связывания α -токсинов скорпионов с Na_v , при котором модуль специфичности и сердцевина связываются с внеклеточными петлями в повторе I домена поры и потенциал-чувствительным доменом повтора IV соответственно. Примечательно, что недавние структурные работы подтверждают эти выводы автора.

Во второй части раздела «Результаты и обсуждение» подробно описывается функциональные и структурные особенности токсина, относящегося к группе ингибиторов активации. Диссертант описывает сайт связывания токсина с Na_v , мембрано-опосредованный механизм такого связывания, а также остатки токсина, задействованные в связывании с каналом и мембраной. Важно отметить, что автор описала первый токсин, селективно взаимодействующий с потенциал-чувствительным доменом повтора I, а также показала способность токсина ингибировать аберрантные токи, возникающие при определенных мутациях в генах Na_v .

Каждая часть раздела «Результаты и обсуждение» завершается заключением, в котором А.А. Беркут суммирует основные результаты и показывает возможность их будущего применения.

Актуальность темы диссертации

Натриевые каналы Na_v , изучению лигандов которых посвящена работа, это трансмембранные белки, отвечающие за селективный перенос ионов натрия внутрь клетки согласно электрохимическому градиенту. Эти каналы широко представлены в организме млекопитающих и, в частности, человека и

выполняют ряд важных физиологических функций. Нарушение работы Na_v является причиной ряда нервно-мышечных и сердечно-сосудистых расстройств. Поэтому поиск селективных лигандов Na_v актуален при разработке лекарственных препаратов для лечения таких заболеваний.

Помимо этого, понимание основ таксономической селективности лигандов Na_v существенно для создания биопестицидов, избирательно воздействующих на насекомых.

Как отмечалось выше, работа А.А. Беркут посвящена анализу механизмов лиганд-рецепторных взаимодействий двух групп модуляторов Na_v с мишенями, в частности, физико-химических свойств лигандов, определяющих их таксономическую селективность.

Особую практическую ценность имеет детальная характеристика пептида, способного подавлять так называемые ω -токи через обычно непроницаемые для ионов потенциал-чувствительные домены. Такие токи возникают при определенных мутациях в генах Na_v и являются причиной редкого мышечного заболевания, гипокалиемического периодического паралича.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов

Все результаты получены А.А. Беркут и соавторами впервые, являются оригинальными и значимыми для биофизики возбудимых мембран, молекулярной и структурной биологии. Результаты работы важны для дальнейших фундаментальных исследований основ функционирования Na_v и механизмов связывания с ними различных лигандов, в частности нейротоксинов. Отдельно следует отметить, что в рамках представленной работы в α -токсинах скорпионов впервые выделены 2 структурных модуля, а также описан первый лиганд Na_v , селективно взаимодействующий с потенциал-чувствительным доменом первого повтора Na_v .

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

Диссертация А.А. Беркут является актуальным исследованием. Полученные в работе результаты и сформулированные выводы соответствуют положениям, выносимым на защиту, и не вызывают сомнений в их достоверности. На высокий уровень проведенных исследований указывают также статьи, опубликованные по результатам работы, а также список конференций, на которых проводилась апробация полученных результатов. Так, результаты диссертационной работы опубликованы в 6 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК, и представлены на ряде международных и российских конференциях.

Замечания по диссертационной работе

Диссертационная работа Беркут А.А, оформлена в соответствии с требованиями, написана грамотно и ясно, в целом является качественной, и подтверждает высокий уровень квалификации диссертанта. Сильной стороной работы является комплексный подход к исследованию. Тем не менее, диссертация не лишена некоторых недостатков:

1. В литературном обзоре присутствует несколько неточностей и опечаток, а именно:
 - Стр 14. *«Р-Петли обладают значительной конформационной подвижностью и тем самым обуславливают структурную асимметрию ПД.»*. Структурная асимметрия домена поры обусловлена не конформационной подвижностью, а тем, что четыре повтора имеют различную аминокислотную последовательность.

- Стр. 15. *«Внешнее кольцо селективного фильтра образовано отрицательно заряженными а.о., имитирующими гидратную оболочку катиона Na^+ (EE(M/D/N)D-мотив).»*. **Отрицательно заряженные боковые цепи не имитируют гидратную оболочку Na^+ .**
- Стр. 34. *«... что подтверждается также структурой комплекса Na_v с μ -конотоксином GIIIА [21].»* **Это, видимо, опечатка. Опубликована структура комплекса Na_v с μ -конотоксином KIIIА, но не более крупным GIIIА.**

2. Некоторые представления о структуре натриевых каналов и характере их взаимодействия с лигандами, приведенные в литературном обзоре, кажутся несколько устаревшими в свете недавних структурных работ. Например:

- Стр. 19. ... инактивационные ворота... *«физически перекрывают поток ионов»*. **Это представление, устарело, как и сам термин «инактивационные ворота», применяемый к описанию процесса быстрой инактивации эукариотических натриевых каналов.** В крио-ЭМ структурах этих каналов так называемая инактивационная петля не блокирует открытую пору (как считали ранее), а связывается с внешней стороной выстилающих пору спиралей и аллостерически переводит активационные ворота в закрытое состояние.
- Стр. 46, Рис.11. **Приведенная модель связывания местного анестетика в пору канала устарела.** В частности, не показана область селективного фильтра, с которой по данным расчетов и недавней кристаллической структуры взаимодействует заряженная группа блокатора.

3. Стр. 84. Обсуждается избирательное связывание токсинов с внеклеточными петлями каналов насекомых и млекопитающих, но **не приведены выравненные последовательности этих петель у разных каналов.**

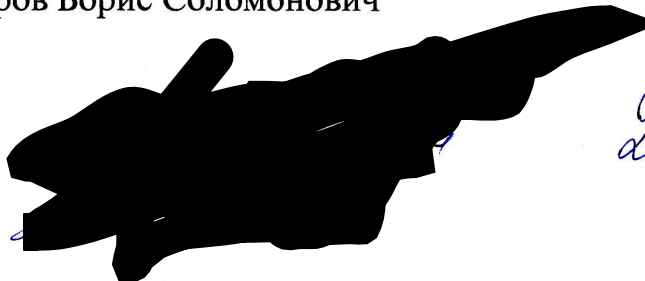
4. Стр. 94. «...для ингибиторов активации Na_v общепринятым считается механизм действия, называемый мембрано-опосредованным захватом сенсора потенциала [246, 297]: токсины сначала связываются с липидной мембраной клетки, затем дрейфуют по мембране, связываются с натриевым каналом и фиксируют его в неактивированном состоянии». **Оппонент не уверен, что есть достаточные основания считать данный механизм общепринятым в предложенном варианте.** Опираясь на какие данные автор утверждает, что ингибиторы активации «сначала связываются с липидной мембраной клетки, затем ... связываются с натриевым каналом»?

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация 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 Антонина Анатольевна Беркут заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, главный научный сотрудник (консультант)
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт
эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН»
Жоров Борис Соломонович



20 ноября 2019 г.

Контактные данные: тел.: 7 [REDACTED] e-mail: [REDACTED]

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

Адрес места работы:

194223, г. Санкт-Петербург, проспект Тореза, д. 44

Федеральное государственное бюджетное учреждения науки «Институт
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН»

Тел.: 7(812)552-79-01; e-mail: [REDACTED]

Подпись сотрудника организации

Жорова Б.С. удостоверяю



Полностью
удостоверяю
за канцелярией
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук

Б.С. Жорова
[REDACTED]
20.11.2019
М.Т. Ахметов