

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
НА ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ
ПОЗДНЯКОВА И.А.**

**"КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ: ВЫЯВЛЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ
И РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОДХОДА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ",**

**представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

Объектом своего исследования И.А. Поздняков выбрал очень интересную и очень сложную группу эукариотных микроорганизмов – динофлагеллят. Эти жгутиконосцы распространены повсеместно и играют важную роль в функционировании самых разных типов экосистем, являясь важнейшими первичными продуцентами. Известно, что динофлагелляты способны к вспышкам размножения, наиболее часто наблюдаемым у водных, в том числе, токсин-продуцирующих видов. Зачастую это приводит к накоплению токсичных веществ в воде и морепродуктах и может негативно влиять на хозяйственную деятельность человека. Несмотря на свою очевидную практическую значимость, динофлагелляты, между тем, до сих пор остаются одной из наименее изученных групп. Новейшие молекулярно-филогенетические исследования позволили прояснить филогенетическое положение динофлагеллят, определив их расположение в макротаксоне Alveolata вместе со споровиками и инфузориями. Однако в основном этим все и ограничилось. Большинство вопросов, связанных с функциональной спецификой клеток динофлагеллят, регламентирующей их роль в различных экосистемах, на сегодняшний день остаются неразрешенными. Одной из объективных причин, тормозящих прогресс в этом направлении, является отсутствие секвенированных геномов динофлагеллят. Современные технологии секвенирования попросту не позволяют проводить эффективные геномные исследования этой группы, представители которой наделены одними из самых больших и сложных геномов среди эукариот. В последнее время, однако, обозначился альтернативный подход, основанный на секвенировании и последующей сборке транскриптомов. Сейчас транскриптомный анализ широко применяется при анализе экспрессии генов в различных группах эукариот, и именно этот инструмент был использован диссертантом в его работе при изучении разнообразия ионных каналов у динофлагеллят. Ионные каналы играют определяющую роль в физиологии клетки, принимая участие в процессах клеточной регуляции и передачи

сигналов. У эукариотных микроорганизмов их роль гипертрофирована, в силу вовлечения в сложнейшие поведенческие процессы, реализующиеся на организменном уровне. Очевидно, что изучение тонких механизмов, лежащих в основе взаимоотношений клетки-организма с окружающей средой, невозможно без понимания функциональной роли различных типов этих трансмембранных белковых комплексов. Между тем, до сих пор наука не располагает сколько-нибудь значимыми данными даже о том, какие именно типы ионных каналов и как широко представлены в разных группах одноклеточных эукариот, и динофлагелляты служат тому ярким примером.

Все выше изложенное позволяет мне сделать вывод о том, что диссертационная работа И.А. Позднякова "Катионные каналы динофлагеллят: выявление разнообразия и разработка экспериментального подхода для исследования функциональной активности" представляет собой в высшей степени актуальное, оригинальное научное исследование, посвященное решению одной из важных проблем современной биологии.

Диссертационная работа И.А. Позднякова представлена в одном томе на 197 страницах машинописного текста, из которых последние 30 (стр. 168–197) – это «Приложение». В «Приложение» вынесены 2 таблицы и 24 рисунка. Основной текст диссертации изложен на 167 страницах, содержит 48 иллюстраций и 3 таблицы. Диссертантом использована традиционная для квалификационных работ структура. В начало рукописи вынесен список сокращений, затем следует «Введение», 4 основные главы: «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты», «Обсуждение»; далее следуют: «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и «Благодарности». Библиография включает 156 литературных источников, из них 144 – иностранных.

Техническое оформление работы выполнено на высоком уровне. Количество опечаток в тексте сведено к минимуму. Все иллюстрации хорошо читаемы и информативны. Ряд пожеланий к оформлению отдельных рисунков будут рассмотрены в комментариях к конкретным главам. Здесь хочу заметить, что мне показалась не очень удачной использованная диссертантом нумерация таблиц и рисунков с привязкой их к конкретным главам и «Приложению», вместо традиционной – сквозной. Это абсолютно не мешает при чтении работы, но создает определенные трудности при ее формальном анализе и несколько загромождает ссылки. Хочу особо отметить, что диссертация написана очень хорошим языком с минимальным количеством стилистических погрешностей.

Введение (стр. 8-13) представляет собой краткую характеристику работы, выполненную по классической схеме. Здесь диссертант обосновывает актуальность

проблемы, на решение которой направлено его исследование, затем последовательно описывает цель и задачи, научную новизну, практическое и теоретическое значение и т.д. Все эти разделы написаны в соответствии с рекомендациями ВАК, а содержащиеся в них сведения не оставляют сомнений в том, что работа И.А. Позднякова отвечает квалификационным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Цель своего исследования диссертант формулирует предельно четко: «выявить разнообразие катионных каналов динофлагеллят и разработать экспериментальный подход для исследования их функциональной активности». В такой постановке актуальность и фундаментальный характер решаемой проблемы, на мой взгляд, абсолютно очевидны. Отдельно хочу остановиться на сформулированных И.А. Поздняковым «задачах исследования», а также на «положениях, выносимых на защиту» (стр. 10). Эти важнейшие элементы квалификационных работ продуманы и представлены, с моей точки зрения, диссертантом безупречно. Поставленной цели диссертант обоснованно предполагает достичь путем решения 4 взаимосвязанных задач. 1. Идентифицировав представителей суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов у динофлагеллят с помощью анализа транскриптомных баз данных. 2. Исследовав филогению четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят. 3. Исследовав методами биоинформатики структуру селективного фильтра, сегментов S4 и участка инактивационных ворот четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят. 4. Разработав подход, позволяющий применять метод локальной фиксации потенциала на мембране к клеткам армированных динофлагеллят, и выявив на примере модельного объекта *Prorocentrum minimum* активность ионных каналов путем регистрации трансмембранных ионных токов. Совершенно очевидно, что если диссертанту удастся решить эти задачи, то цель исследования будет достигнута.

Диссертант выносит на защиту 3 основных положения. Не буду их перечислять, отмечу, лишь, что все они органически вытекают из решения поставленных задач и являются оригинальными производными защищаемой квалификационной работы.

Глава 1. Обзор литературы (стр. 15-59). Глава в целом написана очень хорошо. Диссертантом проделан большой труд по разностороннему анализу материалов из более чем 150 источников, в число которых входят, как ставшие уже раритетными региональные фаунистические сводки по динофлагеллятам первой половины прошлого столетия, так и работы текущего 2016 года. Очень удобным является распределение всего массива данных по 3 основным подглавам. В первой из них дается достаточно полная и

разносторонняя характеристика динофлагеллят, во второй – не менее качественный и подробный анализ современных знаний о ионных каналах и методе локальной фиксации потенциала на мембране, а в третьей суммированы немногочисленные и разрозненные данные, касающиеся предшествующих исследований ионных каналов у динофлагеллят.

Глава 2. Материалы и методы (стр. 60-68). Глава состоит из 4 разделов, в которых описаны основные методологические составляющие диссертационной работы И.А. Позднякова. Впечатляет арсенал методов, которыми овладел диссертант. От рутинных – культивирования и микроскопии микроорганизмов до методов экспериментальной электрофизиологии и аналитической биоинформатики. Диссертант не только освоил разнообразные методики исследований, но и внес свой вклад в их развитие, предложив оригинальный подход, позволяющий изучать ионные каналы динофлагеллят с помощью метода локальной фиксации потенциала на мембране. Достоверность данных, полученных И.А. Поздняковым не вызывает сомнений. Это в первую очередь определяется воспроизводимостью всех проведенных исследований, а в необходимых случаях подтверждается статистическим анализом конкретных результатов. У меня нет замечаний по этой главе диссертации за исключением короткой ремарки относительно первого раздела, посвященного методике культивирования модельного вида динофлагеллят – *P. minimum*. Диссертант достаточно подробно описал происхождение культуры, культуральную среду и режимы освещения. Однако целый ряд важных моментов, характеризующих процессы культивирования микроорганизмов, он не сообщает. Например, как была получена культура - из одной клетки или из случайной выборки похожих организмов, ксеничная или аксеничная культура использована в работе, в каких емкостях проводилось культивирование, в каком объеме среды, и какова была численность организмов в зрелой культуре? Не сомневаюсь, что диссертант располагает всеми этими данными, однако без них раздел, посвященный культивированию, выглядит довольно сиротливо. Этот недочет ни в коем случае не снижает общей высокой оценки главы «Материалы и методы», которая, несомненно, характеризует диссертанта как универсального и высоко профессионального экспериментатора с большим творческим потенциалом.

Глава 3. Результаты (стр. 69-122). Это основная глава диссертации, в которой представлены результаты оригинальных исследований И.А. Позднякова. Поскольку диссертант является одним из первопроходцев в изучении ионных каналов у динофлагеллят, неудивительно, что эта часть его диссертационной работы изобилует новыми фактами и гипотезами. Открывает главу раздел, посвященный поиску

представителей суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов в транскриптомах динофлагеллят. Здесь диссертант использует анализ двух транслированных транскриптомов динофлагеллят *Prorocentrum minimum* из транскриптомной базы данных морских эукариотных микроорганизмов MMETSP. В основу этой части работы положен поиск в транскриптомах динофлагеллят последовательностей аминокислотных остатков, гомологичных известным аминокислотным последовательностям катионных каналов человека из базы данных белковых последовательностей NCBI. Технически работа выполнена на высоком современном уровне с использованием хорошо зарекомендовавшего себя алгоритма BLASTP в программном пакете BioEdit. Диссертанту удалось впервые показать, что динофлагелляты обладают ионными каналами, которые относятся минимум к 10 семействам, входящим в состав суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов – группы, объединяющей большинство известных на сегодняшний день ионных каналов. Описания аминокислотных последовательностей каждого из выявленных типов, хорошо проиллюстрированы матрицами множественного выравнивания гомологичных участков аминокислотных последовательностей. Очень интересен обнаруженный И.А. Поздняковым феномен присутствия в транскриптомах динофлагеллят удвоенных последовательностей катионных каналов, активируемых циклическими нуклеотидами, и потенциал-управляемых калиевых каналов. Соглашусь с диссертантом, что вероятность того, что это химерные образования – артефакты сборки транскриптомов, крайне мала. Обнаружение аналогичных удвоенных последовательностей этих каналов у различных динофлагеллят и за пределами группы – у оомицетов, говорит в пользу того, что их присутствие закономерно. Вместе с тем, низкий процент сходства между повторяющимися последовательностями (диссертант здесь использует, на мой взгляд, не вполне корректный оборот «низкая идентичность») не позволяет рассматривать их как классические тандемные повторы, в целом, широко представленные в геноме динофлагеллят. Диссертант склоняется к двум основным гипотезам, способным объяснить выявленный им феномен: удвоенные последовательности K_v и HCN/CNG каналов могут быть результатом образования временных полицистронных пре-мРНК, или же предполагают существование двухдоменных каналов в данных семействах. Соглашусь с диссертантом, что на сегодняшний день ни одна из этих гипотез не кажется предпочтительной. Последними в ряду выявленных диссертантом семейств потенциал управляемых ионных каналов динофлагеллят, рассматриваются четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы (ЧД ПКК). Это позволяет автору

последовательно перейти к двум следующим, очень интересным разделам главы: «Филогенетический анализ четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят» (стр. 80) и «Анализ структуры функционально значимых участков аминокислотных последовательностей четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят» (стр. 93). Раздел, посвященный филогении, написан очень интересно и включает анализ нескольких филогенетических гипотез дивергентных процессов становления современного разнообразия ЧД ПКК динофлагеллят. Диссертант на качественно разных выборках (SAR, Eukaryota) тестирует гипотезы филогенетического разнообразия ЧД ПКК методами максимального правдоподобия и байесовского анализа. При этом, во всех случаях, Поздняковым доказано наличие минимум 4 независимых кластеров ЧД ПКК у динофлагеллят. Эти кластеры консервативны по составу формирующих их ионных каналов динофлагеллят, но могут включать и ЧД ПКК ряда других представителей SAR и более дистанцированных групп эукариот. У меня есть ряд небольших замечаний к оформлению филогенетических схем, представленных в этом разделе. Во-первых, существует общепринятая практика – выделять на приводимых схемах обсуждаемые в данной работе кластеры. На всех филограммах А, В, С, D кластеры ЧД ПКК динофлагеллят следовало выделить 4 различными цветами или, хотя бы, инверсией исходного белого цвета. Это значительно облегчило бы визуальный анализ деревьев и существенно сэкономило время читателей. Во-вторых, схемы, на которых представлены ко-филограммы, аннотированы только в своей оригинальной части. Остается неясным, каково происхождение фрагментов филогений эукариот, представленных на этих схемах. Без ссылок на оригинальные источники, из которых они заимствованы, они могут восприниматься как произвольные рисунки автора, а это на самом деле не так. Также меня не устроило одно из заключений диссертанта по этому разделу. На стр. 129 он пишет следующее: «Соответствие между филогенией ЧД ПКК, реконструированной в настоящей работе, и филогенией эукариот, реконструированной другими авторами на основании консервативных генов, свидетельствует об адекватности полученных нами результатов». Соответствие филогений в данном контексте ничего общего с оценкой адекватности результатов не имеет. Если бы такая связь не была выявлена, результаты от этого в своей «адекватности» нисколько бы не проиграли, просто на первый план вышла бы другая гипотеза формирования современного разнообразия этих каналов, например за счет латерального трансфера генов. Что, вполне вероятно, может происходить и наряду с

дивергентными процессами, учитывая, сколь широко распространено это явление среди эукариотных микроорганизмов (и динофлагеллят, в том числе).

В следующем разделе диссертант, используя методы биоинформационного анализа, тестирует гипотезу функционального разнообразия выявленных ЧД ПКК динофлагеллят. Анализ первичной и вторичной структуры основных элементов этих каналов: селективного фильтра, сегментов S4 и участка инактивационных ворот, приводит его к обоснованному выводу о том, что ЧД ПКК динофлагеллят функционально разнообразны.

Завершает главу «Результаты» раздел, посвященный собственно регистрации активности ионных каналов динофлагеллят. Очень интересная, экспериментальная часть диссертационной работы И.А. Позднякова включает 2 основных раздела. Первый посвящен отработке клеточной модели, пригодной для последующих электрофизиологических экспериментов. Диссертантом разработан метод получения сферопластов армированных динофлагеллят *P. minimum* с помощью ингибитора синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрила. Сферопласты оказались пригодны для регистрации одиночных ионных каналов методом локальной фиксации потенциала на мембране. Фиксация потенциала на неповрежденной мембране сферопласта и на изолированном фрагменте мембраны модельного объекта *P. minimum* позволила диссертанту зарегистрировать активность катион-проводящих каналов этих организмов на уровне одиночных проводимостей. Что и требовалось доказать! Хотя на данном этапе исследований зарегистрированные диссертантом токи не могут быть соотнесены с конкретными семействами катионных каналов, следует подчеркнуть, что им совершен очень важный прорыв в данной области исследований, поскольку им впервые доказана возможность успешной *in situ* регистрации одиночных каналов у динофлагеллят.

Глава «Обсуждение» стр. (123-145) по своей структуре идентична главе «Результаты». Это очень удобно, поскольку значительно упрощает перемещения по тексту в обоих направлениях. Диссертант очень подробно и зрело подвергает анализу все полученные им результаты. Он не ограничивается наиболее очевидными интерпретациями, а в каждом конкретном случае старается рассмотреть несколько гипотез и, анализируя их, предлагает собственное видение проблемы. Собственно на этом этапе и появляются в работе ответы на поставленные в начале диссертации задачи и обосновываются положения, вынесенные И.А. Поздняковым на защиту. Эта глава, как и следующее за ней «Заключение», представляющее квинтэссенцию основных результатов

и выводов, содержащихся в предыдущих главах, написаны очень добротно и грамотно. К этим разделам у меня нет замечаний.

Выводы (стр. 148-149). Выводы, их всего 5, в основном тексте диссертации и в автореферате полностью совпадают. Они логически связаны с полученными в ходе исследования результатами, объективны и достоверны. Выводы полностью отвечают главной цели исследования, содержат решения всех поставленных задач и поддерживают все положения, вынесенные диссертантом на защиту.

Завершая отзыв, отмечу, что основные материалы диссертации опубликованы в 3 статьях автора в журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследований И.А. Позднякова были представлены на многочисленных отечественных и международных съездах и конференциях. Автореферат достаточно полно отражает основные положения диссертационной работы и оформлен в полном соответствии с требованиями ВАК РФ.

Заключение. Резюмируя все вышеизложенное, считаю, что диссертация И.А. Позднякова «Катионные каналы динофлагеллят: выявление разнообразия и разработка экспериментального подхода для исследования функциональной активности» является научно-квалификационной работой и соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата наук. Высказанные в процессе написания отзыва пожелания и замечания носят достаточно частный характер и не снижают общей очень высокой положительной оценки этой работы. Считаю, что ее автор И.А. Поздняков безусловно заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

5 декабря 2016 г.



Фролов Александр Олегович
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник
лаборатории по изучению паразитических
червей и протистов
ФГБУН Зоологический институт РАН,
тел.: 89215910718, e-mail: frolal@yandex.ru,
199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., д. 1, ЗИН РАН

