

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию **Позднякова Ильи Андреевича**

«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

Одной из важнейших и актуальных проблем современной биологии и биофизики клетки является выяснение структурно-функциональной организации, механизмов регуляции и патологии ионных каналов мембран. Ионные каналы участвуют практически во всех процессах жизнедеятельности клеток как в норме, так и при патологии. Значение их для физиологии животных хорошо известно, однако физиологическая роль ионных каналов одноклеточных эукариот остается малоизученной, несмотря на то, что одни из первых работ по биофизике клеточных мембран были выполнены на инфузориях еще в начале прошлого века. Недостаток данных об ионных каналах протистов связан, в первую очередь, с их труднодоступностью для экспериментальных исследований. В то же время информация об ионных каналах одноклеточных организмов представляется чрезвычайно важной для понимания физиологических процессов, лежащих в основе разнообразных экологических функций микроорганизмов. Кроме того, исследования ионных каналов одноклеточных эукариот необходимы для понимания путей эволюции этих макромолекулярных белковых комплексов.

В связи с этим, протисты, и динофлагелляты в частности, сочетающие в себе свойства клетки и целого организма, являются новыми интересными объектами для изучения молекулярной организации и функциональной роли ионных каналов. С одной стороны, динофлагелляты играют важную роль, как в нормальном функционировании водных экосистем, так и при формировании опасных цветений прибрежных вод, а их токсины являются причиной отравлений многих видов животных и человека. С другой стороны, эта группа эукариот филогенетически удалена от животных, грибов и растений, что делает ее привлекательной и для исследований в области эволюции ионных каналов. При этом об ионных каналах динофлагеллят практически ничего не известно.

Диссертация **И.А. Позднякова**, посвященная исследованию разнообразия катионных каналов у динофлагеллят, а также разработке экспериментального подхода, обеспечивающего возможность регистрации активности каналов, открывает новые перспективы в этой области, что делает ее чрезвычайно интересной и **актуальной**.

Диссертация изложена на 197 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану: включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, содержащий 156 публикаций, и приложение. Работа иллюстрирована 72 рисунками и 5 таблицами. Диссертация написана четко, логично, с интересом читается.

Во введении автор обосновал актуальность работы, сформулировал цели и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, научную новизну работы, ее теоретическую и практическую значимость. Введение также содержит информацию о личном вкладе автора, апробации основных результатов исследования и публикациях по теме диссертации.

Глава «Обзор литературы» состоит из трех частей. Первая часть (1.1) посвящена общей характеристике динофлагеллят. В ней автор приводит современные сведения о клеточной и молекулярной биологии этих одноклеточных организмов, их экологической и токсикологической роли. Особое место в данной части обзора литературы занимает раздел 1.1.5, в котором подробно описаны современные представления о строении покровов динофлагеллят, и на основе данных литературы предложена обобщающая модель их реорганизации в ходе жизненного цикла этой группы протистов. Критический анализ этих данных литературы крайне важен для успешной адаптации метода локальной фиксации потенциала на мембране к клеткам динофлагеллят. Описаны также особенности использованного в работе модельного объекта – *Prorocentrum minimum*, широко распространенного в Балтийском море. В разделе 1.2 обзора литературы обсуждается классификация катионных каналов эукариот, принятая в современных статьях по эволюции ионных каналов; описано разнообразие и эволюция катионных каналов. В этом разделе проведен анализ самых последних данных литературы об эволюции семейства четырехдоменных потенциал-зависимых катионных каналов, включающего в себя гомологов потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов. Обсуждаются имеющиеся данные литературы об ионных каналах динофлагеллят. В целом, обзор оставляет приятное впечатление. Изложение материала проведено на высоком теоретическом уровне и свидетельствует о широкой эрудиции автора.

Важность и достоверность получаемых результатов в любой экспериментальной работе зависит, прежде всего, от адекватности и корректности применения методических подходов. Работа **И.А. Позднякова** выполнена на высоком методическом уровне, с использованием как классических методов клеточной биологии – метода локальной фиксации потенциала на мембране (пэтч-клэмп) и флюоресцентной микроскопии, так и методов биоинформатики и молекулярной филогении. В главе «Материалы и методы»

дается описание использованных в работе методов и подходов, модельного объекта – *Prorocentrum minimum*, баз данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Полученные **И.А. Поздняковым** результаты несомненно являются **новыми**. Анализ транскриптомных баз данных десяти видов динофлагеллят **впервые** выявил высокое разнообразие катионных каналов у одноклеточных организмов этой группы эукариот: 1) потенциал-зависимые калиевые каналы (K_v); 2) калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}); 3) двухпоровые калиевые каналы (K_{2p}); 3) кальций-активируемые калиевые каналы (K_{Ca}); 5) калиевые каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (EAG); 6) катионные каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (HCN/CNG); 7) каналы TRP (TRPV и TRPP); 8) двухпоровые кальциевые каналы (TPC); 9) потенциал-зависимые протонные каналы (H_v) и 10) четырехдоменные потенциал-зависимые катионные каналы – гомологи потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов.

Впервые проведен широкий филогенетический анализ четырехдоменных потенциал-зависимых катионных каналов. Так, в анализе было использовано 277 аминокислотных последовательностей порообразующих субъединиц каналов множества линий эукариот. В результате применения методов молекулярной филогении было обнаружено, что динофлагелляты обладают по крайней мере четырьмя филогенетически обособленными группами четырехдоменных каналов. Использование методов биоинформатики при анализе таких важных с функциональной точки зрения структур четырехдоменных каналов как селективный фильтр, сегменты S4 и участок, гомологичный области инактивационных ворот потенциал-зависимых натриевых каналов, также выявило разнообразие этих каналов на уровне первичной и вторичной структуры. Полученные данные позволили автору сделать предположения о ряде биофизических характеристик четырехдоменных каналов динофлагеллят. Так, **И.А. Поздняковым** было показано, что предполагаемый селективный фильтр проанализированных аминокислотных последовательностей четырехдоменных каналов динофлагеллят имеет вид E/E/E/E или E/Q/E/E, что может свидетельствовать о селективности этих каналов к ионам кальция. Кроме того, среди последовательностей четырехдоменных каналов динофлагеллят были обнаружены последовательности как с богатыми аргинином и лизином, так и с обедненными лизином и аргинином сегментами S4. Последнее обстоятельство дает основания предполагать, что среди четырехдоменных каналов динофлагеллят присутствуют и потенциал-зависимые, и потенциал-независимые каналы. Интересно, что на филограммах оба типа последовательностей могут формировать общие клады (кластеры A1 и A2). Анализ первичной и вторичной структуры участка,

гомологичного области инактивационных ворот потенциал-зависимых натриевых каналов, также выявил разнообразие этой структуры. Наиболее интересным результатом явилось то, что многие четырехдоменные каналы динофлагеллят, по-видимому, имеют в своем составе инактивационную частицу, характерную для потенциал-зависимых натриевых каналов многоклеточных животных.

В ходе работы **впервые** на примере модельного объекта *Prorocentrum minimum* был разработан метод получения сферопластов из клеток армированных динофлагеллят. Предложенный метод основан на использовании ингибитора синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрила. Показано, что использование этого химического агента не только предотвращает образование целлюлозных пластин в клеточных покровах динофлагеллят, но и способствует сбрасыванию уже имеющихся, что делает плазматическую мембрану клетки доступной для образования плотного контакта со стеклянной микропипеткой. Таким образом, данный подход **впервые** позволил автору применить метод локальной фиксации потенциала на мембране для исследования ионных каналов динофлагеллят. Автор демонстрирует успешность нового метода примерами регистрации активности одиночных ионных каналов довольно высокой проводимости. Было бы интересно выявить фармакологический профиль этих каналов.

В главе «Обсуждение» автор критически и на высоком теоретическом уровне анализирует собственные данные, полученные в результате биоинформатического анализа и экспериментальной работы, и сопоставляет их с данными литературы.

Раздел «Заключение» представляет собой краткое обобщение результатов исследования.

Выводы сформулированы автором четко и обоснованно.

При прочтении диссертации возникли следующие вопросы и замечания:

1. Имеются некоторые незначительные замечания по оформлению диссертации. Так, в тексте работы встречаются опечатки (стр.32, 35, 37, 39, 54) и неудачные выражения ('канальных субъединиц', стр. 43; 'гейтинг', стр. 46; 'негативный спайк', стр. 58).

2. Известно, что быстрая инактивация характерна не только для потенциал-зависимых натриевых каналов, но и для некоторых потенциал-зависимых кальциевых каналов, например, для кальциевых каналов N-типа ($Ca_v2.2$). Почему для анализа четырехдоменных потенциал-зависимых катионных каналов динофлагеллят был выбран участок, гомологичный инактивационным воротам именно потенциал-зависимых натриевых каналов (Na_v)?

3. Разделы 3.1–3.3 диссертации посвящены исключительно порообразующим субъединицам катионных каналов. Однако известно, что часто в макромолекулярный

комплекс канала входят также и вспомогательные регуляторные субъединицы, оказывающие существенное влияние на функционирование канала в клеточной мембране. В связи с этим возникает вопрос: что известно о наличии дополнительных регуляторных субъединиц ионных каналов у одноклеточных организмов?

4. В разделе 3.4.5 отмечается отсутствие в литературе данных об ионном составе цитозоля клеток динофлагеллят. В связи с этим возникают вопросы: 1) делались ли попытки его определения? и 2) делались ли попытки прямого измерения трансмембранного потенциала клеток *Prorocentrum minimum* с помощью конфигурации «целая клетка» или прокалывающего микроэлектрода?

5. В диссертации был выявлен широкий спектр катионных каналов у динофлагеллят. Какова возможная функциональная роль этих каналов?

Несмотря на замечания и возникшие вопросы представленная работа является целостным и актуальным исследованием. Диссертация **И.А. Позднякова** выполнена на высоком научном и методическом уровне, заслуживает высокой оценки, в ходе ее выполнения получены **новые приоритетные** данные по **актуальной** проблеме.

Диссертация **И.А. Позднякова** имеет теоретическое и практическое значение для клеточной биологии одноклеточных организмов в целом и динофлагеллят в частности. Полученные автором новые данные по разнообразию катионных каналов у динофлагеллят являются существенными для понимания эволюции ионных каналов у эукариот. Разработанный автором метод получения сферопластов динофлагеллят перспективен с точки зрения исследования физиологической роли ионных каналов у столь экологически важной группы протистов.

Основные результаты и выводы диссертации отражены в 13 публикациях, в том числе в 3 статьях из списка рецензируемых журналов, рекомендованных ВАК РФ, и в 10 тезисах, а также в автореферате; их можно рекомендовать для использования в работе биологических факультетов ряда университетов, в частности в Санкт-Петербургском государственном университете, Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого, Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН, Институте цитологии РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН, а также в учебном процессе соответствующих вузов.

Заключение. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости и объему проведенных исследований диссертация **Ильи Андреевича Позднякова «Катионные каналы динофлагеллят: выявление разнообразия и разработка экспериментального подхода для исследования функциональной активности»**

**Заведующая кафедрой биофизики
Биологического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования
«Санкт-Петербургский
государственный университет»,
профессор, доктор биологических наук
по специальности 03.01.02 – биофизика**

З.И. Крутецкая

5 декабря 2016 г.

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9

Санкт-Петербургский государственный университет

Сайт биологического факультета университета: www.bio.spbu.ru

Тел.: +7 (812) 328-94-65

E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

З. И. Крутецкая

ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПБГУ
Н. К. КОРЕЛЬСКАЯ

