

УТВЕРЖДЕНО

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Института физиологии им. И.П. Павлова

Российской академии наук

чл.-корр. РАН Л.П. Филаретова



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

на диссертационную работу

Позднякова Ильи Андреевича

«Катионные каналы динофлагеллят: выявление разнообразия и разработка экспериментального подхода для исследования функциональной активности», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность исследования

Ионные каналы играют важную роль, выполняя информационную функцию в клетках эукариот. Ряд этих ионных каналов принадлежат к выделяемому на основании гомологии аминокислотных последовательностей суперсемейству потенциал-управляемых катионных каналов. Эволюция этого суперсемейства связана с эволюцией внутриклеточных каскадных процессов клеток эукариот. Их развитие на тканевом уровне привело к возникновению нервной системы у многоклеточных животных. Динофлагелляты представляют собой одну из групп эукариотных организмов, филогенетически удаленных от многоклеточных животных. Можно предположить *a priori*, что исследование структурно-функциональных особенностей строения потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят может привести к обнаружению их принципиально новых характеристик. Всестороннее изучение ионных каналов, являющихся участниками важнейших физиологических процессов в клетке, должны способствовать лучшему пониманию молекулярных механизмов в области клеточной биологии. Отметим, что структурно-функциональные характеристики ионных каналов динофлагеллят и их физиологическая роль, остаются малоизученными. Поэтому исследование транскриптомов динофлагеллят с использованием методики локальной фиксации потенциала представляется весьма важным и актуальным.

Научная новизна работы

В диссертационной работе И.А. Позднякова с помощью анализа транскриптомов десяти видов динофлагеллят впервые показано, что динофлагелляты обладают большинством семейств катионных каналов, относящихся к суперсемейству потенциал-управляемых катионных каналов. К их числу относится и семейство четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов. Проведенный автором филогенетический анализ этого семейства ионных каналов впервые показал, что динофлагелляты, как и многоклеточные животные, обладают несколькими филогенетически обособленными группами (подсемействами) этих каналов. Кроме того, с помощью биоинформатического анализа аминокислотных последовательностей четырехдоменных каналов динофлагеллят впервые были определены их важные структурно-функциональные детерминанты. В ходе выполнения данной работы автору впервые удалось применить метод локальной фиксации потенциала к клеткам армированных динофлагеллят, благодаря разработанному им подходу, основанному на применении ингибитора синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрила. Данный подход позволил впервые зарегистрировать активность одиночных ионных каналов у этих микроорганизмов.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая и практическая значимость работы определяется ее эволюционной направленностью. Данные о разнообразии и филогении потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят важны для понимания эволюции ионных каналов у эукариот. Кроме того, в этой работе был впервые проведен биоинформатический анализ первичной и вторичной структуры ряда функционально значимых участков четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов, результаты которого имеют высокую прогностическую ценность для дальнейшего изучения этого важного с точки зрения эволюции возбудимых мембран семейства ионных каналов. Особо следует отметить значимость разработки метода получения сферопластов из клеток армированных динофлагеллят, который впервые позволил применить метод локальной фиксации потенциала для регистрации ионных каналов данных микроорганизмов. Возможность применения этого электрофизиологического подхода открывает широкие возможности для прямого исследования ионных каналов динофлагеллят *in situ*, а следовательно, и для выявления их физиологической роли.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 197 страницах машинописного текста и состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы (156 источников, из них 144 на иностранном языке) и приложение. Материалы диссертации иллюстрированы 72 рисунками и 5 таблицами.

Во введении автор обосновал актуальность исследования, сформулировал его цель и задачи, основные положения, выносимые на защиту, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, а также указал сведения о личном вкладе автора, апробации работы и количестве публикаций по теме диссертации.

Глава «Обзор литературы» имеет три раздела (1.1–1.3). В первом разделе изложены общие представления о биологии динофлагеллят и модельном объекте *Prorocentrum minimum*. Особое место в разделе, посвященном динофлагеллятам, занял критический анализ литературных данных о строении покровов динофлагеллят, что явилось важным этапом в разработке метода получения сферопластов. Второй раздел данной главы посвящен современным сведениям о разнообразии семейств потенциал-управляемых катионных каналов и эволюции четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов. Имеющиеся данные об ионных каналах динофлагеллят помещены в третий раздел обзора литературы.

В главе «Материалы и методы» диссертант подробно описал клеточно-биологические, биоинформатические и электрофизиологические методы, использованные в данном исследовании, в том числе и разработанный автором метод получения сферопластов из клеток армированных динофлагеллят *P. minimum*.

В главе «Результаты» И.А. Поздняков привел данные об идентифицированных у динофлагеллят семействах потенциал-управляемых катионных каналов, филогенетическом разнообразии четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят, разнообразии структурно-функциональных детерминант этого семейства каналов. Кроме того, приведена детальная характеристика разработанного метода получения сферопластов из клеток динофлагеллят *P. minimum* и продемонстрированы первые записи, полученные в результате регистрации активности одиночных ионных каналов динофлагеллят. В качестве основных результатов исследования можно отметить следующие. В транскриптах динофлагеллят были выявлены представители десяти семейств катионных каналов, входящих в состав суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов, а именно: 1) потенциал-управляемые 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; 8) двухпоровые кальциевые каналы (TPC); 9) потенциал-управляемые протонные каналы (H_v) и 10) четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы. Филогенетический анализ выявил, что динофлагелляты обладают по крайней мере четырьмя группами четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов. Биоинформатический анализ первичной и вторичной структуры таких функционально важных участков порообразующих субъединиц четырехдоменных каналов как селективный фильтр, сегменты S4 и инактивационные ворота, выявил их структурное разнообразие у четырехдоменных каналов динофлагеллят. С помощью ингибитора синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрила был разработан подход к получению сферопластов из клеток армированных динофлагеллят, впервые позволивший применить к этим одноклеточным организмам метод локальной фиксации потенциала на мембране и, таким образом, впервые зарегистрировать активность одиночных ионных каналов у динофлагеллят.

В главе «Обсуждение» диссертант сопоставил полученные им результаты с опубликованными данными по ионным каналам у одноклеточных эукариот и их эволюции. Автором сделаны предположения о возможной функциональной роли идентифицированных семейств каналов у динофлагеллят. Кроме того, отдельный подраздел обсуждения посвящен критическому анализу полученных данных о необычных удвоенных последовательностях, гомологичных последовательностям порообразующих субъединиц каналов семейств K_v и HCN/CNG. Также критическому анализу подвергнуты данные о получении сферопластов *P. minimum* помощью 2,6-дихлорбензонитрила. Следует отметить, что, хотя в обсуждении результатов регистрации трансмембранных ионных токов И.А. Поздняков и делает попытку соотнести полученные записи активности одиночных каналов с идентифицированными им при анализе транскриптомов семействами катионных каналов, он заключает, что «ни один из зарегистрированных токов не может быть с уверенностью отнесен ни к одному из известных семейств катионных каналов, поскольку для точной идентификации ионных каналов необходимы детальные электрофизиологические и молекулярно-биологические исследования». Таким образом, автор отмечает, что основным результатом работы в части электрофизиологических исследований является разработка подхода, позволяющего успешно применять столь эффективный метод – метод локальной фиксации потенциала на мембране – к клеткам динофлагеллят.

В «Заключении» приведено обобщение результатов исследования. Выводы обоснованы и полностью соответствуют полученным результатам.

Замечаний по диссертационной работе И.А. Позднякова нет.

Опубликованные работы в достаточной мере отражают содержание диссертации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 10 тезисах. Основные положения прошли апробацию на российских и международных научных конференциях, и семинарах.

Заключение

Диссертационная работа Позднякова Ильи Андреевича «Катионные каналы динофлагеллят: выявление разнообразия и разработка экспериментального подхода для исследования функциональной активности» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новый подход к решению актуальной научной задачи – исследованию ионных каналов у динофлагеллят.

Содержание автореферата полностью отражает основные результаты, изложенные в диссертации. Выводы диссертации обоснованы и полностью соответствуют полученным результатам.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертация Позднякова Ильи Андреевича соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к кандидатской диссертации, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

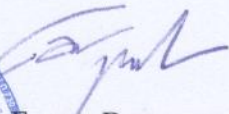
Отзыв рассмотрен и утвержден на межлабораторном заседании лаборатории возбудимых мембран и лаборатории физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (протокол № 3 от 5 декабря 2016 г.).

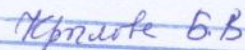
Заведующий лабораторией физиологии
возбудимых мембран Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Института физиологии им.

И.П. Павлова Российской академии наук,
доктор биологических наук
по специальности 03.00.13 – физиология,
профессор

05.12.2016




Борис Владимирович Крылов


Крылов Б.В.
Визитка

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6

Тел. (812) 328-13-01, факс (812) 328-05-01

Электронная почта: krylov@infran.ru

Сайт организации: www.infran.ru