

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Юнусовой Валентины Алексеевны «Поровые блокаторы калиевых каналов из яда беспозвоночных и их производные», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология»

### **Актуальность темы исследования**

Актуальность темы диссертационной работы Юнусовой В.А. обусловлена важной ролью калиевых каналов в регуляции электрической активности клеток и поддержании физиологических процессов в организме. Так, потенциал-чувствительные калиевые каналы участвуют в формировании мембранного потенциала, проведении нервного импульса, регуляции пролиферации клеток и иммунного ответа. Нарушения их функционирования ассоциированы с развитием ряда патологических состояний, что делает их перспективными объектами фармакологических исследований.

Среди известных лигандов калиевых каналов особый интерес представляют пептидные поровые блокаторы, способные высокоаффинно и селективно ингибировать проведение ионного тока. Такие соединения используются в качестве молекулярных инструментов для изучения структуры, функций и механизмов работы калиевых каналов, а также рассматриваются как перспективные кандидаты для разработки на их основе новых лекарственных препаратов. В связи с этим поиск и получение новых поровых блокаторов калиевых каналов, а также изучение молекулярных механизмов их действия представляют собой актуальную задачу современной токсинологии, что и легло в основу диссертационной работы Юнусовой В.А.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В диссертационной работе проведено комплексное исследование пептидных поровых блокаторов калиевых каналов различного происхождения. Уточнена аминокислотная последовательность токсина OsK2 из яда скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*, исследованы структурные детерминанты активности токсинов подсемейства  $\alpha$ -КТх и получены новые блокаторы каналов подсемейства Kv1. Наиболее значимым результатом работы является открытие новой группы токсинов пауков, получившей название муринотоксинов. Идентифицированы два представителя этой группы (MnTx-1 и MnTx-2), показано, что их пространственная организация отлична от структуры всех известных пептидов – блокаторов поры калиевых каналов. Кроме того, разработана флуоресцентная система для визуализации бактериального калиевого канала KcsA и поиска его лигандов. Полученные результаты расширяют репертуар известных поровых

блокаторов калиевых каналов, что может быть использовано при разработке новых фармакологических средств.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа имеет логичную и последовательно выстроенную структуру, соответствующую требованиям, предъявляемым к исследованиям данного уровня, и включает разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 114 страницах, содержит 35 рисунков и 9 таблиц. Библиографический список включает 259 источников, что отражает достаточную степень проработки исследуемой темы.

Раздел «Материалы и методы» содержит описание всех экспериментальных процедур, использованных автором в ходе выполнения диссертационной работы. Для получения результатов был применен широкий спектр современных подходов молекулярной биологии, биохимии и биофизики, включая методы геной инженерии, хроматографии, электрофизиологии, а также масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР. Кроме того, автором использованы современные компьютерные методы обработки экспериментальных данных.

Глава «Результаты и обсуждение» представлена четырьмя самостоятельными направлениями, объединенными общим объектом исследования – пептидными поровыми блокаторами калиевых каналов из ядов беспозвоночных животных. Автор осуществляет всесторонний анализ исследуемых объектов, последовательно расширяя и углубляя получаемые знания. Так, если в первом разделе главы автор лишь находит неточности в установленной ранее последовательности токсина OsK2, то во втором – переходит к анализу структурных детерминант активности всех пептидов того же подсемейства. В результате были получены не только новые данные о механизмах взаимодействия поровых блокаторов с их мишенью, но и разработаны активные соединения. Третья часть работы посвящена всестороннему изучению новых токсинов (муринотоксинов) из яда паука, действующих по механизму порового блока. Это примечательно, так как все известные токсины пауков, активные по отношению к калиевым каналам, являются модуляторами сенсора потенциала. Автор проводит комплексный анализ муринотоксинов, подробно выясняя как особенности их действия, так и структурные характеристики. Заключительный раздел диссертационной работы посвящен разработке новых подходов для поиска изучаемых пептидов как в яде животных, так и в других источниках. В качестве мишени был выбран бактериальный калиевый канал KcsA, так как репертуар его известных селективных ингибиторов ограничен. Для реализации проекта была сконструирована

флуоресцентная система, состоящая из искусственного пептида Hui1 и зеленого флуоресцентного белка eGFP. В разделе приводятся эксперименты, доказывающие эффективность разработанного подхода. В целом, представленные результаты изложены понятно, подробно обсуждены и хорошо согласуются с поставленными целью и задачами исследования.

### Достоверность результатов

Достоверность результатов обеспечена многократной повторяемостью экспериментов, использованием взаимодополняющих методов (масс-спектрометрия, ЯМР, круговой дихроизм, электрофизиология, флуоресцентная микроскопия) и корректной статистической обработкой данных. Основные результаты опубликованы в трех статьях в международных научных журналах (в том числе в *Cellular and Molecular Life Sciences* и *BBA Biomembranes*) и представлены на профильных научных конференциях, что подтверждает их высокий уровень.

### Вопросы и замечания к диссертационной работе

При общей высокой оценке работы возникли следующие вопросы и замечания:

1. Установлено, что замена I17N и отсутствие С-концевого амидирования в токсине OsK2 снижают его активность более чем в 5000 раз. Проводилась ли попытка получить рекомбинантный OsK2 с ферментативным амидированием *in vitro* (например, с использованием пептидилглицин- $\alpha$ -амидирующей монооксигеназы)? Или, возможно, рассматривался вариант химического синтеза пептида с амидированным С-концом?
2. Введение мотива K-C-X-N в пептид Pi-7 привело к появлению высокой активности в отношении Kv1.2, но не Kv1.3, в то время как его гомолог Pi-1 активен в отношении обоих каналов. С чем, по мнению диссертанта, связана такая селективность? Рассмотрены ли отличия во вторичной структуре или зарядовом распределении между Pi-7[KCIN] и Pi-1?
3. По флуоресцентной системе: константа диссоциации eGFP-Hui1 с KcsA составила 35 нМ, а немеченого Hui1 — 8 нМ. Чем объясняется разница в 4 раза? Вносит ли eGFP вклад в снижение аффинности за счет стерических помех или неспецифического взаимодействия с мембраной?
4. В диссертации указано, что работа имеет практическую значимость для создания биоинсектицидов и лекарственных препаратов. Планируется ли тестирование наиболее активных токсинов (например, MnTx-1) на моделях *in vivo*?

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают научной ценности работы.

### Заключение

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Юнусовой Валентины Алексеевны полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017 г. №650; 20.03.2021 г. №426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.22 г. №1690; 26.01.2023 г. №101), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология.

### Официальный оппонент

Главный научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, член -корреспондент РАН, доктор биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

Митькевич Владимир Александрович



119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Тел. (499) 135-98-24

E-mail: mitkevich@eimb.ru

«25» мая 2026 г.

Подпись д.б.н. Митькевич В.А. удостоверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН, к.ф.-м.н.

М.П.



Коновалова Е.В.

