

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **Люкмановой Екатерины Назымовны**

«Структурные основы функционального многообразия трехпетельных белков человека и нейротоксинов змей», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Представленная к защите работа Люкмановой Е.Н. посвящена исследованию трехпетельных белков семейства L α 6/uPAR. Наиболее известными представителями трехпетельных белков являются альфа-нейротоксины змей, высокоспецифичные ингибиторы никотиновых и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов. На протяжении многих лет трехпетельные нейротоксины использовались в качестве инструментов для изучения структуры и функции этих рецепторов, вовлеченных во множество жизненно-важных процессов. В последнее время появилось много работ, посвященных обнаружению трехпетельных белков и у других животных, от морских звезд до млекопитающих. В отличие от нейротоксинов змей, эндогенные трехпетельные белки нетоксичны и играют регуляторную функцию. Однако, конкретная роль каждого из более чем десяти описанных в настоящее время L α 6/uPAR белков человека в функционировании организма остается малоизученной, что делает исследования, которым посвящена диссертационная работа, высоко актуальными.

Для достижения целей диссертационной работы автор применил комплексный подход с привлечением методик из самых разных разделов молекулярной биологии. В качестве основных направлений исследований работы Люкмановой Е.Н. можно выделить: разработку рекомбинантных систем продукции трехпетельных белков человека и трехпетельных нейротоксинов змей; исследование фармакологических мишеней трехпетельных белков; изучение пространственной структуры трехпетельных белков и построение моделей их комплексов с мишенями; и изучение молекулярных механизмов действия и роли трехпетельных белков человека в функционировании мозга и эпителия.

Диссертация изложена на 288 страницах и содержит 117 рисунков и 11 таблиц. Работа построена по классическому принципу и включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и Методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Благодарности» и «Список использованной литературы». Список цитируемой литературы содержит 394 ссылки.

Обзор посвящен описанию функциональных и структурных особенностей никотиновых и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, основных мишеней действия изученных в работе трехпетельных белков. Особое внимание уделено роли этих рецепторов в патогенезе развития нейродегенеративных и онкологических заболеваний, что облегчает дальнейшее восприятие диссертационной работы. В обзоре также представлены свежие данные о трехпетельных белках, обнаруженных у самых разных животных и описаны их возможные роли в функционировании организма. Фактически, обзор дает не только представление об исследованных в работе объектах, а закладывает основу понимания актуальности диссертационной работы в целом.

Раздел «Материалы и методы» представляет собой подробное описание всех методик, использованных в работе. Использованные плазмиды и клеточные линии сведены в отдельные таблицы, что значительно разгружает текст этого раздела. Подходы и методы описаны достаточно подробно, что особенно важно, так как в работе использовались методы, относящиеся к самым разным областям биологических наук.

Основную часть диссертационной работы Люкмановой Е.Н. занимает раздел «Результаты и обсуждение». Исследования Люкмановой Е.Н. делятся на четыре направления. Первое направление посвящено поиску оптимальных систем рекомбинантной продукции трехпетельных белков, которые представляют собой небольшие пептидные молекулы, стабилизированные системой дисульфидных связей. Наличие дисульфидных связей значительно затрудняет рекомбинантную продукцию этих белков. Однако, как показано в работе, большинство из них может быть с успехом ренатурировано из нерастворимых цитоплазматических телец включения клеток *E. coli*. Тем не менее, решение этой задачи потребовало тщательного подбора условий ренатурации для каждого из изученных белков.

Второе направление посвящено поиску структурных детерминант, важных для взаимодействия трехпетельных нейротоксинов яда змей с их мишенями. В диссертационной работе показана важность центрального петлевого участка токсинов змей для взаимодействия с никотиновыми и мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами, а также с ГАМК-рецепторами. Изучение пространственной структуры и внутримолекулярной динамики нейротоксина WTX в растворе методами ЯМР-спектроскопии выявило необычайно высокую конформационную пластичность петлевых участков. Это позволило предположить, что такая пластичность необходима для взаимодействия токсина со структурно различными мишенями, от мускариновых рецепторов, принадлежащих семейству GPCR, до лиганд-управляемых ионных каналов

никотиновых рецепторов. Следует отметить, что схожая аномальная пластичность петлевых участков была обнаружена при дальнейших исследованиях трехпетельных белков человека. Возможно, это свойство является отличительной чертой белков семейства L α 6/uPAR, а исследованные ранее конформационно стабильные молекулы нейротоксинов змей, являются скорее исключением из правила. Отдельная часть диссертационной работы посвящена способности трехпетельных нейротоксинов взаимодействовать с биологическими мембранами. Высказано оригинальное предположение о том, что мембранное окружение никотинового ацетилхолинового рецептора может играть важную роль в формировании комплекса токсин-рецептор.

Третьим направлением исследований Люкмановой Е.Н. является изучение структуры и функции трехпетельных белков из мозга человека. В этой части работы получен ряд уникальных данных, проливающих свет на роль нейромодуляторов L α nx1 и L α pd6 в функционировании ЦНС. Эндогенные нейромодуляторы закреплены в мембране нейронов с помощью гликоинозитольного (GPI) якоря. Поэтому для проведения структурно-функциональных исследований в работе были получены водорастворимые варианты белков, не содержащие GPI-якоря. Это позволило определить фармакологические мишени действия, определить пространственную структуру нейромодуляторов, построить модели взаимодействия с мишенями, а также значительно продвинуться в понимании механизмов действия этих нейромодуляторов в мозге. Исследование эндогенных нейромодуляторов, проведенные в диссертационной работе, имеют выход на практическое применение в области разработки новых лекарственных препаратов. С использованием животных моделей, показана возможность использования водорастворимого варианта L α nx1 для компенсации нарушений когнитивных процессов, наблюдаемых при болезни Альцгеймера и других состояниях, связанных с дисфункцией работы холинергической системы мозга. Кроме того, в работе был выявлен участок молекулы L α nx1, ответственный за взаимодействие с никотиновым рецептором альфа7 типа, который отвечает за регуляцию когнитивной функции и синаптической пластичности. Таким образом, работа Люкмановой Е.Н. имеет большую практическую значимость для разработки лекарственных препаратов, нацеленных на лечение нейродегенеративных заболеваний.

В рамках концепции эндогенных нейромодуляторов, усиливающих действие рецепторов мозга, удивительными кажутся противоположные свойства другого изученного трехпетельного белка человека – L α pd6. В работе показано, что этот белок ингибирует альфа7 никотиновые рецепторы и, в отличие от L α nx1, подавляет синаптическую пластичность (долговременную потенциацию на переживающих срезах гиппокампа). Конечно, конкретную функцию отрицательных модуляторов, белков подобных L α pd6, в

системе высшей нервной деятельности млекопитающих только предстоит выяснить. Однако важным результатом диссертационной работы является сам факт обнаружения эндогенных отрицательных нейромодуляторов и предположение о наличии механизма тонкой (положительной/отрицательной) регуляции холинергической системы мозга.

Четвертое направление диссертационной работы Люкмановой Е.Н. посвящено секретируемым трехпетельным белкам эпителия человека SLURP-1 и SLURP-2. Точечные мутации этих белков приводят к развитию ряда кожных заболеваний. Для обоих белков определены мишени действия, описана роль в регуляции гомеостаза эпителия и изучены пространственные структуры. В недавних работах было показано, что экспрессия SLURP-1 значительно снижена в ряде карцином, и уровень снижения экспрессии коррелирует со степенью злокачественности опухоли. Это позволило автору предположить взаимосвязь между экспрессией трехпетельных белков эпителия и развитием солидных опухолей. Для проверки этой гипотезы клетки различных карцином обрабатывались рекомбинантными препаратами SLURP-1 и SLURP-2 и было показано значительное снижение пролиферации раковых клеток. Эффективность SLURP-1 и SLURP-2 была выше эффективности препаратов, в настоящее время применяемых в лечебной практике. Еще одной интересной находкой диссертационной работы Люкмановой Е.Н. стало обнаружение экспрессии Lynx1 в клетках карцином, а также антипролиферативная активность этого трехпетельного белка. Для белков SLURP-1 и Lynx1 были изучены внутриклеточные сигнальные каскады, запускаемые в раковых клетках под действием рекомбинантных белков, и предложены механизмы, лежащие в основе их антипролиферативной активности. Несомненно, эта часть работы Люкмановой Е.Н. также имеет большую практическую ценность, так как не только описывает функцию трехпетельных белков эпителия человека, но и открывает новые перспективы в разработке противоопухолевых препаратов.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Однако, есть несколько вопросов которые требуют прояснения:

- 1) В работе показано, что в раковых клетках под действием SLURP-1 и Lynx1 активируется ряд транскрипционных факторов, происходит изменение экспрессии генов и меняются концентрации эндогенных альфа7 никотинового рецептора и SLURP-1. Однако изменение экспрессии генов в мозге модельных животных под действием Lynx1 не изучено. Более того, в тексте несколько раз высказывается предположение о том, что увеличение синаптической пластичности под действием Lynx1 связано с потенцированием альфа7 никотинового рецептора. Не может ли реализовываться более сложная связь, когда под воздействием Lynx1 происходит изменение экспрессии генов факторов или рецепторов, влияющих на синаптическую пластичность?

2) Для SLURP-1 показано, что в раковых клетках под его действием активируются внутриклеточные сигнальные каскады по метаботропному механизму в результате взаимодействия альфа7 никотинового рецептора с G-белками. А что происходит в случае воздействия Lynx1 на раковые клетки легкого? По какому механизму, ионотропному или метаботропному происходит активация сигнальных каскадов при взаимодействии Lynx1 с альфа7-рецептором в раковых клетках?

Указанные замечания ни в коей мере не снижают крайне положительного впечатления о диссертационной работе Люкмановой Е.Н. Поражает количество методов и подходов, привлеченных автором для выполнения этого комплексного междисциплинарного исследования. Полученные Люкмановой Екатериной Назымовной результаты не вызывают сомнений, представленные в работе выводы обоснованы. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в многочисленных научных публикациях автора, в ведущих зарубежных и отечественных рецензируемых журналах, рекомендованных для опубликования основных результатов диссертаций.

Диссертация Люкмановой Е.Н. «Структурные основы функционального многообразия трехпетельных белков человека и нейротоксинов змей» полностью соответствует требованиям «Положения 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; от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Люкманова Екатерина Назымовна заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 -Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории
Регуляции экспрессии генов в развитии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биологии гена
Российской академии наук, д.б.н., проф. РАН
119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5
Тел. (916) 406-23-30
E-mail: yul.biogen@gmail.com

Шидловский Юлий Валерьевич

Подпись д.б.н Шидловского Ю.В.
«Удостоверяю»
Ученый секретарь ИБГ РАН
д.б.н. Набирочкина Е.Н.



ПОДПИСЬ Шидловского Ю.В.
ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь ИБГ РАН Набирочкина Е.Н.

31.10.2019г.