

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию **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.

Мембранные белки составляют примерно треть всех белковых последовательностей, закодированных в геноме человека. Эти молекулы играют ключевую роль в межклеточной сигнализации, а также выполняют транспортные, энергетические и другие функции в клетке. С точки зрения медицины, одним из самых важных классов мембранных белков являются ионотропные рецепторы. Эти белки напрямую участвуют в синаптической передаче, а также задействованы в восприятии некоторых сигналов, например, боль, температура и др. Большинство из этих рецепторов представляют собой перспективные мишени для разработки новых лекарственных препаратов.

Основным направлением исследований, представленных в диссертационной работе Люкмановой Е.Н., являются структурно-функциональные исследования трехпетельных белков, действующих на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. Известно, что последние играют важную роль во многих жизненно важных процессах, включая функционирование центральной нервной системы, нейромышечных окончаний, иммунной системы и гомеостаза эпителия. С дисфункцией этих рецепторов связано развитие ряда заболеваний нервной системы, а табакокурение может быть причиной развития злокачественных карцином. В связи с этим весьма актуальными являются как фундаментальные исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, так и поиск препаратов нового поколения для лечения патологий, связанных с этими рецепторами. Именно к таким исследованиям и относится работа Люкмановой Е.Н.

Диссертационная работа Люкмановой Е.Н. охватывает целый ряд фундаментальных и прикладных задач, включающих в себя: (1) разработку систем гетерологической продукции рекомбинантных аналогов трехпетельных белков человека и нейротоксинов змей; (2) исследование пространственной структуры каждого полученного белка и построение моделей комплексов трехпетельных белков с лиганд-связывающими доменами никотиновых и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов; (3) изучение спектра фармакологической активности трехпетельных белков; (4) поиск структурных детерминант,

важных для взаимодействия трехпетельных белков с теми или иными мишенями; (5) исследование влияния трехпетельных белков человека на физиологические процессы в экспериментах на модельных клеточных линиях или на модельных животных.

Работа содержит 288 страниц, 117 рисунков и 11 таблиц. Диссертация выполнена по традиционной схеме и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Благодарности» и «Список использованной литературы». Литературный обзор имеет объем 50 страниц, и содержит две главы. Первая глава посвящена структурно-функциональным характеристикам никотиновых и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов. Особое внимание уделено роли этих рецепторов в патогенезе нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Во второй главе автор приводит данные по функции трехпетельных белков различного происхождения, от рыб, амфибий и пресмыкающихся, до млекопитающих и человека. Подробно описаны известные мишени действия трехпетельных белков и их взаимосвязь с различными патологическими состояниями. Обзор сопровождается иллюстрациями высокого качества. Общее число ссылок, приведенных в обзоре, составляет 212 источников, большая часть которых является ссылками на работы последних лет, что дополнительно подчеркивает актуальность темы исследования.

Раздел «Материалы и методы» (третья глава), содержит подробное описание праймеров, плазмид, штаммов, клеточных линий и экспериментальных методик, использованных в диссертационной работе. Впечатляет широкий арсенал методик, который был применен для достижения целей работы. Были использованы методы из самых разных областей биологических наук: это и белковая инженерия, структурная биология, клеточные технологии, нейробиология и работа с лабораторными животными. Наряду со стандартными методиками, автор использовал уникальные разработки в области белковой инженерии, структурной биологии и нейробиологии. Все методики достаточно детализированы и не вызывают сомнений в возможности воспроизведения.

Больше половины диссертационной работы составляет четвертая глава, посвященная описанию и обсуждению полученных результатов. Практически все полученные результаты сопровождаются красочным графическим материалом, и по необходимости дополнены данными статистического анализа. Эта часть работы содержит 81 иллюстрацию, что значительно облегчает понимание и восприятие материала.

Глава «Результаты и обсуждение» разделена на четыре части. В первой части автор приводит подробное описание подходов, использованных для разработки систем

рекомбинантной продукции трехпетельных нейротоксинов и белков человека. Здесь приводится сравнительный анализ эффективности различных систем для получения в клетках *E. coli* дисульфид-богатых белков, к которым относятся и трехпетельные белки. Стоит отметить, что рекомбинантная продукция дисульфид-богатых белков – непростая задача, требующая большого опыта и мастерства.

Вторая часть раздела «Результаты и обсуждение» посвящена исследованию структурных детерминант, важных для взаимодействия трехпетельных нейротоксинов с их мишенями. Основными объектами исследования этой части работы являлись нейротоксин II из яда *Naja oxiana* и токсин WTX из яда *Naja kaouthia*. Для этих токсинов показана важность центральной петли для взаимодействия с мишенями, а также, возможное вовлечение мембранного окружения никотинового ацетилхолинового рецептора во взаимодействие с токсинами.

В третьей части раздела «Результаты и обсуждение» описаны исследования двух трехпетельных нейромодуляторов из мозга человека Lynx1 и Lypd6. Для этих белков впервые проведена идентификация их фармакологических мишеней и показано, как они влияют на работу никотиновых ацетилхолиновых рецепторов типа альфа7 в мозге. Показано наличие конкуренции между Lynx1 и бета-амилоидным пептидом за связывание с альфа7 никотиновым рецептором. Это позволило автору предположить способность Lynx1 компенсировать нарушения работы холинергической системы мозга, наблюдаемые при разных патологических состояниях, в том числе при болезни Альцгеймера. Очень сильной частью работы Люкмановой Е.Н. является как раз проверка и подтверждение этой гипотезы на модельных животных. Автором был разработан нестандартный неинвазивный подход для доставки нейромодулятора в мозг: интраназальное введение. Серия поведенческих тестов и электрофизиология на срезах гиппокампа животных, получавших интраназальную терапию рекомбинантным препаратом Lynx1 в течение всего двух-трех недель, показали значительное улучшение когнитивной функции. Положительные результаты этой части работы наряду с определением активного участка в молекуле Lynx1 и успешный синтез пептида-миметика, позволяют рекомендовать автору перейти от фундаментальных исследований к разработке и тестированию препарата для лечения когнитивных расстройств.

Четвертая часть раздела «Результаты и обсуждение» посвящена двум трехпетельным белкам человека SLURP-1 и SLURP-2, которые секретируются клетками эпителия, а также изучению функции белка Lynx1 в эпителии. В работе Люкмановой Е.Н. впервые охарактеризованы мишени действия белков SLURP. Показано, что SLURP-1 и SLURP-2 регулируют рост кератиноцитов. Для белка SLURP-2 показано, что он может

взаимодействовать как с никотиновыми, так и с мускариновыми рецепторами разного типа, при этом эффект SLURP-2 на пролиферацию кератиноцитов зависит от того, с какими именно из рецепторов-мишеней взаимодействует этот трехпетельный белок. Автором впервые показано, что трехпетельные белки эпителия человека могут подавлять рост клеток карцином различного происхождения. Проведено исследование внутриклеточных сигнальных каскадов, запускаемых при обработке клеток карцином рекомбинантными препаратами трехпетельных белков. Показано, что в случае SLURP-1 имеет место регуляция метаботропной активности никотинового ацетилхолинового рецептора, вероятно опосредованная G-белками, взаимодействующими с рецепторами альфа7 типа. Для SLURP-1 и Lunx1 предложены механизмы, лежащие в основе их противоопухолевого действия, и проведено обсуждение различий этих механизмов. Эта часть работы, несомненно, имеет большой практический потенциал. Разработка новых противоопухолевых препаратов на основе белков человека, обладающих, вероятно, низкой иммуногенностью и токсичностью, представляет собой интересную задачу, и в качестве рекомендации на будущее я бы предложил автору исследовать активность трехпетельных белков *in vivo*.

Резюмируя, можно утверждать, что диссертационная работа Люкмановой Екатерины Назымовны, безусловно, является серьезным, законченным, научным трудом, выполненном на высочайшем экспериментальном и теоретическом уровне. Представленная работа описывает громадный экспериментальный материал, полученный автором в содружестве с его коллегами из ИБХ РАН и других российских и зарубежных научных институтов. Умение организовать столь сложные и разноплановые исследования с участием нескольких территориально удаленных друг от друга научных коллективов заслуживает отдельного упоминания. В результате выполнения работы наши знания о роли трехпетельных белков и никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в функционировании организма человека существенно возросли. Получены уникальные результаты и показана перспектива дальнейшего развития этой темы.

Недостатки работы носят в основном редакционный характер. Так, местами встречается научный жаргонизм, вместо слова «фолд» уместнее было бы использование русских слов «укладка» или «структура». В диссертационной работе присутствует небольшое количество опечаток, например, на странице 205, вторая строка сверху два раза подряд написано слово «что». Во второй части раздела «Результаты и обсуждение» можно было бы обсудить возможное наличие мембраносвязывающих сайтов и у других трехпетельных нейротоксинов, а также трехпетельных белков человека. Не лишним было бы обсуждение потенциального участка молекулы SLURP-1, важного для проявления его

антипролиферативной активности, хотя бы опираясь на литературные данные по точечным мутациям, приводящим к развитию кожных заболеваний. Однако, эти замечания несколько не умаляют научной ценности работы Люкмановой Е.Н., носят рекомендательный характер и никак не портят общее впечатление.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных публикациях автора, результаты работы доложены на самых престижных российских и зарубежных конференциях. По своей актуальности и новизне представленного материала, уровню изложения, а также по его теоретическому и практическому значению диссертационная работа Люкмановой Е.Н. «Структурные основы функционального многообразия трехпетельных белков человека и нейротоксинов змей» полностью отвечает критериям, 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; от 29.05.2017 г. № 650), а сам автор Люкманова Екатерина Назымовна несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 -Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией
Молекулярных основ действия
Физиологически активных соединений
Федерального государственного
Бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им.
В.А. Энгельгардта Российской
академии наук, чл.-корр. РАН, д.х.н.



Кочетков Сергей Николаевич

ГСП-1, 119991, г. Москва,
Ул. Вавилова, д.32.
Тел: +7(499)135-23-11
e-mail: kochet@eimb.ru

Подпись чл.-корр. РАН, д.х.н. Кочеткова Сергея Николаевича
«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН



Бочаров А.А.