

## 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.

### **Актуальность**

Диссертационная работа Люкмановой Е.Н. посвящена исследованию трехпетельных белков человека и нейротоксинов змей. В настоящее время трехпетельные белки обнаружены у самых разных с точки зрения эволюции животных: у иглокожих, пресмыкающихся, амфибий, рыб, птиц, и млекопитающих, включая человека. В работе исследованы структура и функция трех трехпетельных нейротоксинов (нейротоксин II и нейротоксин I из яда *Naja oxiana* и «слабый» токсин из яда *Naja kaouthia*), а также четырех трехпетельных белков человека из мозга (Lynx1 и Lypd6) и эпителия (SLURP-1 и SLURP-2). Мишени трехпетельных белков человека, их роль в функционировании организма, а также структурно-функциональные взаимосвязи во всем семействе трехпетельных белков во многом неясны, что и определяет высокую актуальность представленной работы.

Однако, не только этим определяется актуальность диссертационной работы Люкмановой Е.Н. Как показано в работе, трехпетельные белки могут иметь различные мишени в организме, но большинство из них действует на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. Рецепторы этого типа играют важную роль в работе центральной нервной системы и вовлечены в патогенез ряда нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, никотиновые рецепторы, по-видимому, участвуют в развитии онкологических заболеваний, связанных с табакокурением. Нейротоксины змей, как и белки человека, являются удобными инструментами для изучения лиганд-рецепторных взаимодействий. Таким образом, механизмы действия трехпетельных белков, изученные в диссертации, также чрезвычайно актуальны и важны для понимания функционирования целого класса фармакологически важных рецепторов – никотиновых рецепторов ацетилхолина.

### **Научная новизна и практическая ценность**

Для достижения целей диссертационной работы было поставлено и решено несколько новых масштабных и разноплановых по своей сути задач: (1) разработаны

эффективные системы рекомбинантной продукции нескольких трехпетельных белков человека и трехпетельных нейротоксинов змей, (2) исследованы фармакологические свойства и пространственная структура этих белков, а также (3) изучены молекулярные механизмы действия и роль трехпетельных белков человека в функционировании мозга и эпителия.

Важность каждой из этих задач для достижения цели работы не вызывает сомнения. Например, невозможность получить необходимое количество белков человека из природных источников, а также необходимость получать мутантные и меченые белковые препараты для структурно-функциональных исследований, делает необходимым разработку систем рекомбинантной продукции. Стоит отметить, что гетерологическая экспрессия небольших (6-8 кДа) трехпетельных белков, содержащих до шести дисульфидных связей, требует подчас нестандартных подходов и сопряжена с большими трудозатратами.

Учитывая тот факт, что нарушение экспрессии трехпетельных белков человека наблюдается при различных патологических состояниях, диссертационная работа Люкмановой Е.Н. носит не только фундаментальный характер, но и обладает большой практической значимостью. Результаты, полученные в работе показывают, что трехпетельные белки человека действительно могут служить прообразами для новых лекарственных препаратов, нацеленных на лечение нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Разработка лекарств на основе эндогенных белков человека, несомненно, имеет преимущества в виде низкой иммуногенности и токсичности. Более того, полученные в работе системы рекомбинантной продукции трехпетельных белков могут стать первым шагом для создания новых биоинженерных препаратов.

Все полученные результаты обладают высокой степенью научной новизны, что отражено в 30 статьях, опубликованных в престижных международных и отечественных рецензируемых журналах, а также трех патентах Российской Федерации.

### **Общая характеристика диссертации**

Диссертация соответствует традиционному плану и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и Методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Благодарности» и «Список использованной литературы». Работа изложена на 288 страницах и включает 117 рисунков и 11 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 394 ссылки.

Обзор представляет собой две главы, посвященные никотиновым и мускариновым ацетилхолиновым рецепторам, а также трехпетельным белкам. В первой главе изложены

данные по структуре, функции и роли никотиновых и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов в функционировании организма. Вторая глава посвящена функциональному многообразию трехпетельных белков рыб, амфибий, пресмыкающихся, насекомых, птиц и млекопитающих. Описаны известные на сегодняшний день мишени действия трехпетельных белков: никотиновые и мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, ГАМК-рецепторы, кислото-чувствительные ионные каналы, система комплимента, клеточная мембрана и другие. Приведены имеющиеся данные о снижении или повышении уровня экспрессии отдельных эндогенных трехпетельных белков при развитии нейродегенеративных заболеваний и солидных опухолей. Обзор дает достаточно широкое представление об объектах диссертационной работы и подкреплен многочисленными качественными иллюстрациями, значительно облегчающими восприятие материала.

Экспериментальная часть диссертационной работы посвящена описанию методик, использованных в работе. В этой части работы приведено исчерпывающе полное описание олигонуклеотидов, векторов, штаммов, клеточных линий и экспериментальных подходов, использованных в диссертационной работе. Впечатляет масштабность и перечень методов, которые использовал автор для решения поставленных задач. Помимо стандартных подходов геномной и белковой инженерии, в работе были использованы методы структурной биологии, включая ЯМР-спектроскопию и компьютерное моделирование, проводились эксперименты на клеточных модельных линиях, в том числе методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. Ряд результатов диссертационной работы был получен методами электрофизиологии на ооцитах и срезах мозга грызунов, а также с применением поведенческих тестов на модельных животных (мышях). Некоторые приведенные методики являются уникальными разработками автора, о чем свидетельствуют полученные патенты РФ.

Большую часть диссертации Люкмановой Е.Н. занимает раздел «Результаты и обсуждение». В этом разделе работы автор последовательно и логично описывает полученные результаты, уместно сопровождая каждый результат небольшой вводной частью – обоснованием проведения конкретного исследования и предысторией со ссылками на литературные источники. Впечатляет обилие иллюстраций, подтверждающих полученные результаты, которые сопровождаются необходимой информацией о параметрах проведенных экспериментов, и описанием конкретных методов, использованных для статистического анализа данных.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из нескольких частей. В первой части Люкманова Е.Н. описывает подходы к созданию и проводит сравнение различных

экспрессионных систем для продукции трехпетельных нейротоксинов и белков человека. На основе этого анализа для каждого объекта исследования происходит выбор и оптимизация системы продукции для обеспечения высокого выхода рекомбинантного белка с корректной пространственной структурой. Стоит отметить, что для анализа структуры получаемых белков и их мутантных вариантов использовался нетрадиционный подход, основанный на методах ЯМР-спектроскопии. Это, вероятно, было продиктовано низкой информативностью, традиционно применяемого для этой цели, метода КД-спектроскопии.

Во второй части раздела «Результаты и обсуждение» проведен поиск структурных детерминант, важных для взаимодействия нейротоксина II из яда *Naja oxiana* и токсина WTX из яда *Naja kaouthia* с их мишенями. Показано важное значение центральной петли трехпетельных нейротоксинов для взаимодействия с никотиновыми и мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами, а также с ГАМК-рецепторами. Выдвинута гипотеза, что повышенная подвижность этого участка молекулы нейротоксинов может способствовать взаимодействию с несколькими структурно-различными мишенями. Кроме того, было выдвинуто довольно смелое предположение, что важным структурным элементом для взаимодействия трехпетельных нейротоксинов с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами является мембранотропный сайт, который располагается в «голове» токсина. Выдвинута гипотеза, что благодаря этому сайту происходит связывание токсина с мембраной, окружающей рецептор-мишень, и молекула токсина получает преимущественную ориентацию, оптимальную для дальнейшего взаимодействия с лиганд-связывающим участком рецептора.

Следующая часть раздела «Результаты и обсуждение» посвящена двум трехпетельным белкам – нейромодуляторам из мозга человека Lynx1 и Lynx6. Эти белки связаны с мембраной, окружающей никотиновый ацетилхолиновый рецептор, с помощью GPI-якоря, что делает практически невозможным прямые структурно-функциональные исследования природных нейромодуляторов. Для решения этой проблемы в диссертационной работе были получены водорастворимые домены нейромодуляторов с природной аминокислотной последовательностью, но без GPI-якоря. Следует отметить, что для ряда трехпетельных белков показано одновременное существование мембраноассоциированных (GPI-заякоренных) и растворимых форм. В соответствии с этим, в настоящей диссертационной работе в спинномозговой жидкости крысы была обнаружена водорастворимая форма Lynx1. Получение водорастворимых вариантов Lynx1 и Lynx6 позволило провести масштабное структурно-функциональное исследование этих белков. Были идентифицированы мишени их действия, определены пространственные

структуры, изучена внутримолекулярная динамика, и построены модели комплексов нейромодуляторов с лиганд-связывающим доменом альфа7 никотинового ацетилхолинового рецептора. В случае Lynx1 это позволило предсказать важную роль центральной петли нейромодулятора для взаимодействия с рецептором, что было подтверждено с помощью сайт-направленного мутагенеза и химического синтеза пептида, представляющего собой указанный фрагмент молекулы.

В работе Люкмановой Е.Н. впервые была показана конкуренция Lynx1 с олигомерами бета-амилоидного пептида(1-42) за связывание с альфа7 никотиновым рецептором. В настоящее время именно эта форма бета-амилоидного пептида считается ответственной за угнетение когнитивной функции, наблюдаемой при болезни Альцгеймера. На основании наблюдаемой конкуренции автором была выдвинута гипотеза, что Lynx1 может компенсировать нарушение когнитивной функции, связанное с нарушением работы рецептора альфа7 типа. Эта гипотеза была подтверждена в экспериментах на модельных животных, включая трансгенных мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера.

В противоположность положительному модулирующему действию Lynx1, рекомбинантный вариант трехпетельного нейромодулятора Lypdb, оказывал ингибирующее действие на функцию альфа7 рецептора, что было подтверждено методами электрофизиологии на ооцитах шпорцевой лягушки и срезах гиппокампа мыши. Автор предполагает, что, возможно, эта пара нейромодуляторов, обладающая противоположными эффектами на когнитивные процессы, служит для тонкой настройки холинергической системы мозга.

Эпителиальные клетки человека экспрессируют различные типы ацетилхолиновых рецепторов, принимающих участие в регуляции гомеостаза эпителия. Недавно было показано, что наряду с этими рецепторами, эпителиальные клетки также экспрессируют трехпетельные белки, с мутациями в которых, или снижением их экспрессии, связаны различные кожные заболевания и развитие солидных опухолей. В заключительной части раздела «Результаты и обсуждение» впервые исследованы мишени и механизмы действия двух эпителиальных секретируемых трехпетельных белков человека SLURP-1 и SLURP-2, а также белка Lynx1, для которого была продемонстрирована экспрессия в эпителиальных клетках. Впервые показано, что трехпетельные белки эпителия человека могут подавлять рост клеток карцином различного происхождения, что придает особое практическое значение этой части диссертационной работы.

Завершается работа разделом «Заключение» где последовательно и в сжатой форме изложены все наиболее значимые результаты.

## Замечания

Работа Люкмановой Е.Н. не ряда незначительных недостатков. Так, автором не раскрыта тема активных сайтов в молекулах SLURP-1 и SLURP-2, и не совсем ясен механизм, по которому Lypx1 влияет на синаптическую пластичность. В тексте диссертации некоторые рецепторы обозначены в английском написании, другие русскими буквами, присутствуют орфографические и грамматические ошибки.

Тем не менее, эти замечания не снижают общей научной значимости диссертационной работы.

Суммируя сказанное выше, диссертационная работа Люкмановой Екатерины Назымовны выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне и, несомненно, является научным достижением, имеющим, большое фундаментальное значение и практический потенциал. Выводы обоснованы и полностью соответствуют полученным результатам. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных публикациях автора. Таким образом, диссертационная работа Люкмановой Е.Н. «Структурные основы функционального многообразия трехпетельных белков человека и нейротоксинов змей» полностью соответствует требованиям «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), 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.

29.10.2019.

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной генетики РАН  
Чл.-корр. РАН, д.х.н., проф.



Костров С.В.

Подпись чл.-корр. РАН, д.х.н. Кострова С.В.  
«Удостоверяю»  
Ученый секретарь Института молекулярной генетики РАН  
к.б.н.



Андреева Л.Е.

123182 Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2

Телефон: +7-499-196-00-00

e-mail: kostrov@img.ras.ru