

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Кульбацкого Дмитрия Сергеевича «Структурно-функциональные исследования рекомбинантных аналогов белков человека SLURP-1 и SLURP-2», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертационная работа Кульбацкого Д.С. посвящена исследованию структурных и функциональных свойств секретируемых трехпетельных белков человека SLURP-1 и SLURP-2. В качестве модельных объектов выбраны рекомбинантные аналоги, минимально отличающиеся от природных белков (всего одной N-концевой аминокислотой), что позволило осуществить исследования, проведение которых было бы крайне затруднительно или невозможно с белками, выделенными из природных источников.

Актуальность диссертационной работы Кульбацкого Д.С. определяется, во-первых, участием белков SLURP-1 и SLURP-2 в регуляции гомеостаза клеток эпителия, модуляции активности клеток иммунной системы, а также наличием воспалительных заболеваний кожи, связанных с мутациями в генах, кодирующих данные белки. Во-вторых, не-нейрональные никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, которые рассматриваются в данной работе как основная мишень действия белков SLURP-1 и SLURP-2, вовлечены в такие важные физиологические процессы, как пролиферация, дифференцировка и миграция клеток эпителиального происхождения, а также участвуют в развитии индуцированных никотином форм рака.

Диссертация Кульбацкого Д.С. имеет традиционную структуру – состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов. Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 47 рисунков и 1 таблицу, список литературы содержит 119 источников.

Во введении автор обосновывает актуальность темы, формулирует цели и задачи исследования, приводит сведения об апробации работы и положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из двух частей, в первой части изложена современная информация о структуре и функциях не-нейрональных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, во второй части рассказывается о трехпетельных белках (нейротоксинах, трехпетельных белках с GPI-якорем и секретируемых трехпетельных белках), в том числе о белках SLURP-1 и SLURP-2, непосредственно связанных с тематикой данной диссертации. Также во второй части литературного обзора представлены сведения об участии белков SLURP-1 и SLURP-2 в регуляции воспалительных процессов и развитии раковых заболеваний, что связано с обоснованием актуальности темы данной диссертации. Содержание обзора написано хорошим литературным языком и демонстрирует информированность автора о современном состоянии исследований в выбранной области.

В главе «Материалы и методы» приведено исчерпывающее описание использованных в работе методов, позволяющее их воспроизведение при необходимости.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех разделов. Разделы 3.1 и 3.2 посвящены идентификации молекулярной мишени, описанию предполагаемых механизмов действия и описанию пространственной структуры рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2, соответственно. В обоих разделах автор идентифицирует предполагаемые мишени исследуемых белков с помощью метода аффинной экстракции, где показывает, что белки SLURP способны связываться с теми или иными типами никотиновых рецепторов. Для уточнения сайта взаимодействия белка SLURP-1 с никотиновыми рецепторами автор использует метод конкурентного связывания с бунгаротоксином, – специфическим блокатором $\alpha 7$ никотинового рецептора, действующим по ортостерическому сайту рецептора, однако не обнаруживает конкуренции за связывание с $\alpha 7$ рецептором, что говорит о том, что сайт взаимодействия белка SLURP-1 с рецептором не совпадает с сайтом взаимодействия бунгаротоксина. Далее в разделах 3.1 и 3.2 приведены данные электрофизиологии, которые говорят о том, что оба белка обладают модулирующей активностью по отношению к никотиновым рецепторам. Действие белков SLURP-1 и SLURP-2 также охарактеризовано на клеточной модели, – кератиноцитах, и показано, что данные белки могут модулировать пролиферацию, не вызывая при этом апоптоза клеток. Также в разделах 3.1 и 3.2 приведены данные о пространственной структуре белков SLURP-1 и SLURP-2, впервые полученные с помощью метода ЯМР-спектроскопии, а для белка SLURP-2 – данные по моделированию структуры комплекса с внеклеточным доменом никотиновых рецепторов $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 7$ типа. Раздел 3.3 посвящен действию белков SLURP-1 и SLURP-2 на опухолевые линии различного происхождения. Автор впервые показывает, что оба исследуемых белка проявляют антипролиферативную активность, сравнимую с активностью бунгаротоксина, на всех исследуемых линиях за исключением линии аденокарциномы легкого A549 и нормальных кератиноцитов, на которых SLURP-2 оказывает стимулирующее пролиферацию действие. Это отличие автор объясняет предполагаемым различием в репертуаре никотиновых рецепторов, экспрессируемых в исследованных линиях. Также в данном разделе автор впервые описывает изменения в экспрессии генов $\alpha 7$ никотинового рецептора и белка SLURP-1 в клетках линии A431 под действием рекомбинантного SLURP-1 и описывает впервые обнаруженный механизм секреции эндогенного SLURP-1 в клетках линии A431, индуцированной рекомбинантным белком.

Полученные в работе результаты представляют значительный фундаментальный интерес, т.к. они раскрывают ранее не описанные детали взаимодействия трехпетельных белков человека SLURP-1 и SLURP-2 с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами и позволяют использовать данные белки в качестве инструмента для модулирования активности этих рецепторов в различных исследовательских задачах. Кроме того, исследованные в работе белки могут быть использованы в качестве модели для создания лекарственных препаратов, предназначенных для лечения заболеваний, связанных с нарушением функций никотиновых рецепторов и изменением активности эндогенных белков SLURP, и описанных в литературном обзоре к диссертации.

В представленной работе применен целый арсенал подробно описанных и современных методов молекулярной и структурной биологии. Данные собраны в достаточном количестве повторов и обработаны известными методами математической статистики, что позволяет сделать заключение об их высокой достоверности.

Основные результаты работы отражены в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых научных изданиях. Также результаты работы представлены в виде докладов на 12 российских и международных конференциях.

Наряду с описанными выше достоинствами работы следует отметить некоторые недостатки:

1. На рис. 22 и 31 приведены данные по аффинной экстракции мишеней SLURP-1 и SLURP-2, соответственно, в формате вестерн-блота, что не указано в подписи к рисунку. Если данные эксперименты были выполнены более чем в одном повторе, желательно приводить данные, обобщающие результаты всех экспериментов данного типа, а не только единичные изображения.
2. На рис. 41 не приведены данные о статистической значимости полученных результатов, хотя на аналогичных рисунках с столбчатыми диаграммами (например, рис. 28 или рис. 43) указаны уровни значимости и в тексте подписи указан тип применяемого статистического критерия.
3. В подписи к рисунку 42 и в ссылающемся на него фрагменте текста не хватает обоснования выбора клеточных линий (использованы HT-29 и MCF-7) помимо исследуемой линии A431. Возможно, автор использовал эти линии в качестве контролей, однако не указано, каких именно. В автореферате данный рисунок является трудночитаемым, возможно, следовало уменьшить количество представленных на нем данных.
4. Также в тексте встречаются опечатки, в литературном обзоре переведены не все подписи на рисунках.

Высказанные замечания не являются принципиальными и в целом работа выполнена на достойном уровне. Считаю, что диссертационная работа Кульбацкого Дмитрия Сергеевича «Структурно-функциональные исследования рекомбинантных аналогов белков человека SLURP-1 и SLURP-2» отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК, а ее автор – заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» Заместитель директора по научной работе ИНБИ им. А.Н. Баха РАН, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии, доктор биологических наук

Федоров А.Н.

Подпись сотрудника А.Н. Федорова удостоверяется

Ученый секретарь
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, к.б.н.



11.03.2019

в.ч. Орловский

СВЕДЕНИЯ

Об официальном оппоненте диссертации Кульбацкого Дмитрия Сергеевича «Структурно-функциональные исследования рекомбинантных аналогов белков человека SLURP-1 И SLURP-2», представленной на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 03.01.03 –

«Молекулярная биология»

Фамилия, Имя, Отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, ученое звание	Основные научные работы
Федоров Алексей Николаевич	РФ	Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук- заместитель директора по научной работе; Лаборатория молекулярной биотехнологии – заведующий лабораторией	Доктор биологических наук	<p>1. Куров К.А., Саввин О.И., Юркова М.С., Зенин В.А., Нагибина Г.С., Мельник Б.С., Федоров А.Н.. Физико-химическая характеристика варианта апикального домена шаперона GroEL для повышения уровня биосинтеза и увеличения стабильности целевых белков. 2018, <i>Биотехнология</i>, 34(6):43–50.</p> <p>2. Юркова М.С., Саввин О. И., Зенин В. А., Федоров А. Н.. Получение и характеристика безметионинового варианта термостабильного шаперона GroEL из <i>Thermus thermophilus</i>. 2019 <i>Прикладная Биохимия и Микробиология</i>, 55(2):138–143.</p> <p>3. Fedorov A.N., Yurkova M.S.. Molecular Chaperone GroEL – toward a Nano Toolkit in Protein Engineering, Production and Pharmacy. 2018. <i>NanoWorld Journal</i> 04, no. 01, p.8- 15.</p> <p>4. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Yurkova M.S., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment. Data Brief. 2018, Vol. 21, p. 1504-1507.</p> <p>5. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies. Regul Toxicol Pharmacol. 2018, Vol. 97, p. 127-133.</p> <p>6. Trifonova E.A., Nikitin N.A., Ryabchevskaya E.M., Putlyayev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Atabekov J.G., Karpova O.V., Zenin V.A., Yurkova M.S., Fedorov A.N. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus. Antiviral Research. 2017, Vol. 144, p. 27-33.</p>

7. Зенин В.А., Куров К.А., Саввин О.И., Шарапова О.А., Юркова М.С., Федоров А.Н. Подходы к эффективной стабилизации белков с помощью молекулярных шаперонов и их производных. Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2016. Т. 1(1), стр. 225-229.							
8. Sharapova O.A., Yurkova M.S., Fedorov A.N. A minichaperone-based fusion system for producing insoluble proteins in soluble stable forms. Protein Engineering, Design and Selection. 2015, Vol. 29(2), p. 57-64.							

Заместитель директора по научной работе ФИЦ Биотехнологии РАН,
 заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии
 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2
 Тел.: +7 (495) 660-34-30 доб. 175
 e-mail: a.fedorov@fbras.ru
 доктор биологических наук

Федоров А.Н.

Подпись сотрудника А.Н. Федорова удостоверяю:

Ученый секретарь
 Федерального исследовательского центра
 «Фундаментальные основы
 биотехнологии» РАН, к.б.н.

Александр Федорович Орловский