

Отзыв

Официального оппонента на диссертацию Дмитрия Сергеевича Кульбашкого «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.

Работа Д.С. Кульбашкого посвящена изучению взаимодействия рекомбинантных белков SLURP-1 и SLURP-2 с различными субъединицами ацетилхолиновых рецепторов, а также влияния на пролиферацию раковых и нормальных клеточных линий, включая исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе про- и анти-пролиферативной активности данных белков.

Актуальность исследования определяется, в частности, важностью изучения фундаментальных аспектов взаимодействия белков SLURP-1 и SLURP-2 с их молекулярными мишенями, представленными классом ацетилхолиновых рецепторов, в свете участия данных белков в поддержании гомеостаза эпителиальных клеток и в регуляции воспалительных процессов. Также необходимо отметить относительно высокий потенциал практического применения полученных данных, поскольку никотиновые ацетилхолиновые рецепторы участвуют в развитии никотин-индуцированных форм рака.

В представленной работе автором впервые исследовано действие рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2 на никотиновые и, частично, мускариновые ацетилхолиновые рецепторы человека. Впервые показано, что рекомбинантные аналоги SLURP-1 и SLURP-2 могут подавлять пролиферацию нормальных кератиноцитов Het-1A, причем это взаимодействие обусловлено именно никотиновыми рецепторами. С учетом минимальных отличий аминокислотной последовательности рекомбинантных аналогов от природных белков SLURP-1 и SLURP-2, данные результаты позволяют с высокой степенью вероятности судить о схожих механизмах действия эндогенных белков. Аналогично автором показана антипролиферативная активность рекомбинантных белков SLURP-1 и SLURP-2 в отношении опухолевых клеточных линий эпителиального происхождения. Предложен механизм, лежащий в основе этой активности.

Диссертанту удалось продемонстрировать владение широким спектром методик, обеспечивающее комплексный подход в изучении выбранной научной проблемы. В частности, с помощью метода ЯМР-спектроскопии автором впервые была исследована пространственная структура и динамические характеристики молекул SLURP-1 и SLURP-2; полученные данные были использованы для предсказания модели комплекса SLURP-2 с внеклеточными доменами никотиновых рецепторов ацетилхолина.

Диссертация построена по традиционному принципу и включает в себя такие разделы, как введение, литературный обзор, используемые методы и подходы, результаты и их обсуждение, выводы. Список используемых источников содержит 119 ссылок и включает ссылки на статьи, демонстрирующие последние достижения мировой науки по выбранной тематике.

Обзор литературы отражает современное состояние исследуемого вопроса. Помимо описания структуры и механизмов действия исследуемых белков и их мишеней, в обзоре автор уделяет внимание физиологическим функциям как трехпетельных белков, так и никотиновых рецепторов ацетилхолина, что позволяет лучше раскрыть значимость исследуемых вопросов. В то же время, с некоторым удивлением, можно отметить, что в литературном обзоре почти не отведено места для описания белка SLURP-2, его структурных и функциональных отличий от белка SLURP-1. В частности в пункте 1.2.5 белок SLURP-2 вынесен в заголовок наравне с белком SLURP-1, в то время как в тексте данного пункта белок SLURP-2 не упоминается вовсе.

Глава материалы и методы написана в достаточной мере подробно для понимания и воспроизведения опытов. Использование современного оборудования, хорошая воспроизводимость результатов и использование адекватных методик статистической обработки обеспечивают достоверность полученных экспериментальных данных и обоснованность выводов.

Раздел с экспериментальными данными и обсуждением разбит на 3 части, две из которых связаны с идентификацией мишеней действия рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2, а также с уточнением механизма действия этих белков на идентифицированные мишени с помощью электрофизиологических методов, специфических ингибиторов никотиновых рецепторов и конкурентного связывания с модельными никотиновыми рецепторами. Кроме того, в частях 3.1 и 3.2 автор приводит структуры белков, полученные в ходе данной работы и в части 3.2 – результаты молекулярного моделирования комплекса SLURP-2 с внеклеточными доменами $\alpha 7$ в различных конформациях и с внеклеточным доменом $\alpha 3\beta 2$ никотинового рецептора.

Третья смысловая часть главы «Результаты и обсуждение» связана с исследованием действия рекомбинантных аналогов белков SLURP на клеточные линии опухолевого происхождения, что в значительной мере определяет потенциал практического применения полученных диссертантом результатов.

Работа Д.С. Кульбацкого представляется оригинальной, обладает значительной научной новизной и является актуальным, законченным в рамках поставленных задач исследованием, в ходе которого был получен ряд научно-значимых результатов. Объем экспериментальных данных достаточен и всесторонне освещен в 4 публикациях в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и представлен на международных конференциях. Автореферат полноценно отражает содержание текста диссертации.

Диссертационная работа Кульбацкого Д.С. выполнена на высоком уровне и заслуживает положительной оценки, однако, как и в любой диссертации, присутствует ряд недочетов:

- В частности, автору не удалось избежать некоторого числа опечаток: например: стр. 11, абзац 1 «комплиментарную» вместо «комплементарную», стр. 49, абзац 1 «кЫДГКЗ» вместо «гSLURP», стр. 59, абзац 3 «мкL» вместо «мкL», стр. 88, абзац 1 «0.08M» вместо «0.08 mM» и т.д.

- Встречаются различные обозначения одних и тех же объектов: так, например, автор в разделе «Научная новизна и практическая значимость работы» диссертант расшифровывает линию клеток A431, как эпидермоидная карцинома, а в «Положениях, выносимых на защиту» она обозначена, как аденокарцинома кожи.
- В литературном обзоре в рис. 9, 10, 11 не указаны ссылки на литературные источники. Рис. 14 содержит слишком мелкие подписи и является трудночитаемым, кроме того, подписи в данном рисунке не переведены на русский язык.
- В пункте 3.1.3 идет ссылка на рисунок 29, который не имеет никакого отношения к обсуждаемым в данном пункте результатам.
- На рисунке 26 зачем-то приведены данные для воздействия на пролиферацию белка SLURP-2, который в данном разделе не обсуждается. В то же время на том же рисунке отсутствуют данные для контрольных клеток, не подвергавшихся воздействию рекомбинантного SLURP-1.

Также при прочтении работы у оппонента возник ряд вопросов:

- В главе «Материалы и методы» приведена информация об изучении влияния рекомбинантных белков SLURP-1 и SLURP-2 на пролиферацию в различных клетках, в частности, на клеточной линии A172. В то же время в главе «Результаты и обсуждение» не удалось обнаружить информацию о результатах, полученных на данном типе клеток. Написано лишь, что белки SLURP не влияют на рост глиальных линий (данные не приводятся). Также в методах указан анализ фосфорилирования ERK1/2 MAP-киназы, который проводился на клетках феохромоцитомы крысы PC12, но результатов этого анализа, равно как и объяснения, зачем он был нужен, в тексте диссертации не приведено. С чем это связано?
- На рисунках 22 и 31 представлены результаты отрицательного контроля для связывания белков мембранной фракции с магнитными частицами. Чем объясняется относительно высокое неспецифичное связывание с магнитными частицами без иммобилизованного белка на рисунке 31?
- Из рисунка 31 сделан вывод о том, что субъединица никотинового рецептора ацетилхолина не связывается с иммобилизованным белком специфично, поскольку различие с контрольным образцом незначительное. В то же время, визуальное различие с контролем именно для данной субъединицы является наиболее сильным и очевидным. Как объясняется это противоречие?

- Как структурные различия в белках SLURP-1 и SLURP-2 связаны с различным спектром их молекулярных мишеней в клетке? Какими различиями обусловлено возникновение прайминг-эффекта для SLURP-2 и отсутствие такового для SLURP-1 при взаимодействии с $\alpha 7$ никотиновым рецептором ацетилхолина?

Высказанные замечания и заданные вопросы, прежде всего, являются признаком интереса к хорошо выполненной и значимой научной работе и ни в коей мере не являются поводом для снижения высокой оценки представленной диссертации.

Диссертация Кульбацкого Дмитрия Сергеевича на тему «Структурно-функциональные исследования рекомбинантных аналогов белков человека SLURP-1 и SLURP-2», представленная на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология» является самостоятельной и законченной научно-квалификационной работой по актуальной теме, содержит новые научные результаты и соответствует требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24.09.2013 года, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Заместитель директора по научной работе,
руководитель группы моделирования ионных
каналов, ведущий научный сотрудник
лаборатории ионных каналов клеточных мембран
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института цитологии
Российской академии наук, Санкт-Петербург

доктор биологических наук по специальности
03.01.03 — «Молекулярная биология»

О.С. Остроумова

« 12 » марта 2019 г.

Адрес: 194223, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., д. 4, ИНЦ РАН

тел.: +7(812) 297 24 60

e-mail: ostroumova@incras.ru

сайт института: <http://www.incras.ru/>



СВЕДЕНИЯ

Об официальном оппоненте диссертации Кульбацкого Дмитрия Сергеевича «Структурно-функциональные исследования ркомбинантных аналогов белков человека SLURP-1 и SLURP-2», представленной на соискание учёной 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
Остроумова Ольга Сергеевна	РФ	Федеральное государственное учреждение науки «Институт цитологии» Российской Академии наук, заместитель директора по научной работе, ведущий научный сотрудник, руководитель группы моделирования ионных каналов	Доктор биологических наук, доцент	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zakharova A.A., Efimova S.S., Schagina L.V., Malcev V.V., Ostroumova O.S. Blocking ion channels induced by antifungal lipopeptide syringomycin E with amide-linked local anesthetics. <i>Sci. Rep.</i>, 2018, Vol. 8(1), p. 11543. 2. Efimova S.S., Zakharova A.A., Medvedev R.Ya., Ostroumova O.S. Ion channels induced by antimicrobial agents in model lipid membranes are modulated by plant polyphenols through surrounding lipid media. <i>J. Membr. Biol.</i>, 2018, Vol. 251(4), p. 551-562. 3. Efimova S.S., Chulkov I.G., Ostroumova O.S. Lipid-mediated mode of action of local anesthetics on lipid pores induced by polycenes, peptides and lipopeptides. <i>Colloids Surf B Biointerfaces</i>, 2018, Vol. 166, p.1-8. 4. Efimova S.S., Zakharova A.A., Ismagilov A.A., Schagina L.V., Malcev V.V., Bashkirov P.V., Ostroumova O.S. Lipid-mediated regulation of pore-forming activity of syringomycin E by thyroid hormones and xanthene dyes. <i>Biochim. Biophys. Acta</i>, 2018, Vol. 1860(3), p. 691-699. 5. Efimova S.S., Tevzayshova A.N., Olsufyeva E.N., Vukov E.E., Ostroumova O.S. Pore-forming activity of new conjugate antibiotics based on amphotericin B. <i>PLoS One</i>, 2017, Vol. 12(11), p. e0188573. 6. Ефимова С.С., Остроумова О.С. Дипольные молификаторы-регуляторы латеральной гетерогенности липидных мембран. <i>Acta Naturae</i>, 2017, Vol. 9(2), p. 67-75. 7. Ефимова С.С., Захарова А.А., Шагина Л.В., Остроумова О.С. Local anesthetics affect gramicidin A channels via membrane electrostatic potentials. <i>J. Membr. Biol.</i>, 2016, Vol. 249(1), p. 781-787.

8. Chulkov E.G., Ostroumova O.S. Phloretin modulates the rate of channel formation by polyenes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1858(2), p. 289-294.
9. Abkin S.V., Ostroumova O.S., Komarova E.Y., Meshalkina D.A., Shevtsov M.A., Margulis B.A., Guzlova I.V. Phloretin increases the anti-tumor efficacy of intratumorally delivered heat-shock protein 70 kDa (HSP70) in a murine model of melanoma. *Сancer Immun. Immunother.*, 2016, Vol. 65(1), p. 83-92.
10. Ефимова С.С., Захарова А.А., Счагина Л.В., Остроумова О.С. Two types of syringomyelin E channels in sphingomyelin-containing bilayers. *Eur. Biophys. J.*, 2016, Vol. 45(1), p. 91-98.
11. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Malev V.V. Modifiers of membrane dipole potentials as tools for investigating ion channel formation and functioning. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 2015, Vol. 315, p. 245-297.
12. Ефимова С.С., Малев В.В., Остроумова О.С. Effects of dipole potential modifiers on heterogeneous lipid bilayers. *J. Membr. Biol.*, 2016, Vol. 249(1-2), p. 97-106.
13. Ефимова С.С., Захаров В.В., Остроумова О.С. Влияние липольных модификаторов на каналообразующую активность амнигонидных и амнигондоножобных пептидов и липидных бислоях. *Цитология*, 2015, Vol. 57(2), p. 144-152.
14. Chulkov E.G., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Membrane dipole modifiers modulate single-length nystatin channels via reducing elastic stress in the vicinity of the lipid mouth of a pore. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, Vol. 1848(1), p. 192-199.
15. Ефимова С.С., Щагина Л.В., Остроумова О.С. Исследование каналообразующей активности полиненосных антибиотиков в липидных бислоях с использованием липольных модификаторов. *Acta Naturae*, 2014, Vol. 6(4), p. 67-79.
16. Chulkov E.G., Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Direct visualization of solid ordered domains induced by polyene antibiotics in giant unilamellar vesicles. *Chem. Phys. Lipids*, 2014, Vol. 183, p. 204-207.
17. Ефимова С.С., Счагина Л.В., Остроумова О.С. The influence of

				<p>halogen derivatives of thyronine and fluorescein on the dipole potential of phospholipid membranes. <i>J. Membr. Biol.</i>, 2014, Vol. 247(8), p. 739-745.</p> <p>18. Ефимова С.С., Счагина Л.В., Остроумова О.С. Channel forming activity of escorpins in lipid bilayers. Effect of agents modifying the membrane dipole potential. <i>Langmuir</i>, 2014, Vol. 30(26), p. 7884-7892.</p> <p>19. Остроумова О.С., Ефимова С.С., Михайлова Е.В., Счагина Л.В. The interaction of dipole modifiers with amphotericin-ergosterol complexes. Effects of phospholipid and sphingolipid membrane composition. <i>Eur. Biophys. J.</i>, 2014, Vol. 43(4-5), p. 207-215.</p> <p>20. Остроумова О.С., Чаikov Е.Г., Степаненко О.В., Счагина Л.В. Effect of Flavonoids on the phase separation in giant unilamellar vesicles formed from binary lipid mixtures. <i>Chem. Phys. Lipids</i>, 2014, Vol. 178, p. 77-83.</p>
--	--	--	--	--

Д.б.н., доцент
Остроумова Ольга Сергеевна,
заместитель директора по научной работе, ведущий научный сотрудник,
руководитель группы моделирования ионных каналов
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Институт цитологии» Российской Академии наук
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект 4
Тел.: +7(812) 297-24-60
e-mail: osostoumova@mail.ru

Остроумова О.С.

