



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1 В-334 Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,  
факс 8-499-135-14-05, E-mail: [isinfo@imb.ru](mailto:isinfo@imb.ru)  
1066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директора Института молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта РАН  
д.б.н., проф., чл.-кор. РАН Карпов В.Л.  
«27» 05 2019г.

ведущей организации на диссертационную работу Кульбацкого Д.С. «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 изучению рекомбинантных аналогов секретлируемых трехпетельных белков человека SLURP-1 и SLURP-2, исследованию их пространственной структуры и взаимодействию с молекулярными мишенями – никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами.

#### 1. Актуальность выполненной работы

Исследование механизмов взаимодействия белков SLURP-1 и SLURP-2 представляет собой актуальную научную задачу, т.к. эти белки вовлечены в регуляцию воспалительных процессов и гомеостаза эпителиальных клеток, в том числе при развитии воспалительных заболеваний кожи. В качестве мишеней белков SLURP в работе рассматриваются никотиновые ацетилхолиновые рецепторы – лиганд-зависимые ионные каналы, присутствующие в нервно-мышечных контактах, центральной нервной системе, а также в клетках иммунной системы и эпителиальных тканях. В представленной работе исследовано взаимодействие рекомбинантных аналогов белков SLURP с не-нейрональными никотиновыми рецепторами, которые вовлечены в процессы клеточной дифференциации, миграции и апоптоза эпителиальных клеток, а также в развитие индуцированных никотином форм рака. Изучение белков, вовлеченных в столь важные физиологические процессы, несомненно, представляет интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения при разработке прообразов новых лекарственных препаратов, направленных на терапию описанных выше заболеваний.

## **2. Структура и основное содержание диссертации.**

Диссертация Кульбацкого Д.С. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка используемой литературы. Диссертация изложена на 114 листах машинописного текста, список литературы содержит 119 источников.

Обзор литературы состоит из двух смысловых частей, одна из которых посвящена никотиновым рецепторам, их структурной организации и физиологической роли, а вторая – трехпетельным белкам семейства Lyb/uPAR, в том числе непосредственно белкам SLURP-1 и SLURP-2. Вторая часть литературного обзора описывает роль белков SLURP в регуляции воспалительных процессов, контроле гомеостаза эпителиальных клеток и развитии раковых заболеваний, что подчеркивает актуальность выбранной темы. Обзор написан доступным для понимания языком и содержит ссылки на актуальные литературные источники.

В главе «Материалы и методы» приводится описание всех использованных в работе методик на уровне, позволяющем их воспроизведение. Применяемые методы соответствуют современному уровню развития молекулярной и структурной биологии.

Глава «Результаты и обсуждение» является основным разделом представленной работы и содержит три смысловые части: разделы 3.1 и 3.2 посвящены поиску и уточнению молекулярной мишени действия белков SLURP-1 и SLURP-2, соответственно, попыткам выявить сайт взаимодействия данных белков с идентифицированными мишенями, а также исследованию пространственной структуры обоих белков. Раздел 3.3. посвящен изучению влияния рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2 на пролиферацию клеточных линий опухолевого происхождения.

Сформулированные в работе выводы соответствуют полученным результатам и опираются на экспериментальные данные.

## **3. Научная новизна и достоверность полученных результатов и выводов**

В данной работе автором впервые охарактеризовано действие рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2 на никотиновые и, частично, мускариновые ацетилхолиновые рецепторы человека. Показано, что рекомбинантные препараты обладают антипролиферативной активностью как в отношении нормальных кератиноцитов, так и в отношении различных эпителиальных клеточных линий опухолевого происхождения. Впервые установлена пространственная структура обоих белков и проведено моделирование взаимодействия одного из белков (SLURP-2) с внеклеточными доменами двух типов никотиновых рецепторов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается адекватным использованием современных научных методов, грамотным статистическим дизайном и последующей обработкой количественных результатов, наличием необходимых контролей. Достоверность

сформулированных выводов обеспечивается соответствием полученным экспериментальным данным, а также тщательным сопоставлением полученных результатов с ранее опубликованной по данной теме информацией.

По результатам данной работы с участием автора опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК, результаты работы также были неоднократно представлены на российских и международных конференциях. Автореферат и печатные работы полностью отражают содержание диссертации.

#### **4. Значимость полученных результатов для науки и производства**

Теоретическая значимость полученных данных заключается в описании спектра активности рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2 в отношении широкого диапазона никотиновых и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, что не было в достаточной степени освещено в ранних публикациях по теме исследования. Важным является тот факт, что автор не только идентифицировал конкретные типы никотиновых рецепторов, являющихся мишенями данных белков, но и попытался идентифицировать сайт взаимодействия с этими мишенями. Автором описаны нетипичные для трехпетельных белков детали механизмов действия, такие как связывание белка SLURP-1 с  $\alpha 7$  никотиновым рецептором вне сайта связывания агонистов, потенцирования белком SLURP-2 тока через канал  $\alpha 7$  никотинового рецептора при малых концентрациях белка, наличие механизма секреции белка SLURP-1 с положительной обратной связью в клетках линии эпидермальной аденокарциномы A431.

Результаты, полученные в ходе представленной работы имеют не только фундаментальный, но и практический интерес, т.к. никотиновые ацетилхолиновые рецепторы играют важную роль в регуляции многих физиологических процессов.

#### **5. Рекомендации по использованию результатов и выводов**

Исследованные автором рекомбинантные аналоги белков SLURP-1 и SLURP-2 могут служить прообразами для создания первых в своем классе препаратов, направленных на лечение воспалительных заболеваний кожи, ранозаживления, а также для контроля роста опухолей эпителиального происхождения. Кроме того, полученные автором результаты могут быть использованы в фундаментальных исследованиях в области фармакологии никотиновых рецепторов, а рекомбинантные белки SLURP-1 и SLURP-2 могут быть использованы как обратимые модуляторы данного типа рецепторов с известной специфичностью.

#### **6. Замечание и общая оценка диссертационной работы**

Следует отметить, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, полученные результаты изложены в понятной и наглядной форме, однако можно отметить некоторые незначительные замечания:

1. Во второй части обзора литературы достаточно подробно описано современное состояние

исследований, связанных с белком SLURP-1, при этом состояние исследований, посвященных белку SLURP-2, описано более поверхностно.

2. В работе присутствуют некоторые опечатки и неточности. Так, в рисунках 12, 14, 15 не полностью переведены англоязычные подписи, а в рисунках 9 и 10 в литературном обзоре отсутствуют ссылки на источники.

3. В разделе 3.1.2 главы «Результаты и обсуждение» рис. 42 представляет собой набор репрезентативных изображений флуоресцентной микроскопии, и в тексте автор пользуется термином «низкая степень корреляции», говоря о визуальном анализе взаимного расположения различных меток в исследуемых препаратах. Представляется более корректным проведение количественного анализа взаимного расположения указанных меток, по результатам которого можно будет более уверенно говорить о степени корреляции.

Высказанные замечания не снижают общую положительную оценку данной работы, замечание по экспериментальной части носит рекомендательный характер.

### **Заключение**

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 с изменениями №335 от 21 апреля 2016, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв заслушан и утвержден на семинаре Лаборатории молекулярных основ действия биологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской Академии (протокол №\_17\_\_\_ от 19.02.19).

д.х.н., проф., член-корр. РАН  
Кочетков Сергей Николаевич,  
заведующий Лабораторией молекулярных основ  
действия физиологически активных соединений  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки «Институт молекулярной биологии  
им. В.А.Энгельгардта» Российской Академии наук



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,  
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: [isinfo@imb.ru](mailto:isinfo@imb.ru)  
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

11.03.2019 № 12312-2171

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

В Диссертационный совет Д.217.013.01  
НИЦ «Курчатовский институт-  
ГосНИИгенетика»

**Сведения о ведущей организации**

по диссертации Кульбацкого Д.С. «Структурно-функциональные исследования рекомбинантных аналогов белков человека SLURP-1 и SLURP-2», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Полное наименование организации	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
Сокращенное наименование организации	ИМБ РАН
Организационно-правовая форма	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ведомственная принадлежность	Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Почтовый индекс и адрес организации	ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32
Электронная почта организации	<a href="mailto:isinfo@imb.ru">isinfo@imb.ru</a>
Официальный сайт организации	<a href="http://www.eimb.ru">www.eimb.ru</a>
Телефон организации	+7 (499) 135-23-11, +7 (499) 135-11-60
Факс организации	+7 (499) 135-14-05
Директор организации	Макаров Александр Александрович, д.б.н., профессор, академик РАН специальность 03.01.03 – «Молекулярная биология»

**Список работ сотрудников ИМБ РАН за последние пять лет,  
соответствующих тематике оппонируемой диссертационной работы:**

- Smirnova O.A., Bartosch B., Zakirova N.F., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. "Polyamine Metabolism and Oxidative Protein Folding in the ER as ROS-Producing Systems Neglected in Virology" *Int J Mol Sci* (2018), 19, 4, 1219.
- Morozov A.V., Astakhova T.M., Garbuz D.G., Krasnov G.S., Bobkova N.V., Zatsepina O.G., Karpov V.L., Evgen'ev M.B. "Interplay between recombinant Hsp70 and proteasomes: proteasome activity modulation and ubiquitin-independent cleavage of Hsp70" *Cell Stress Chaperon* (2017), 22, 5, 687 – 697.
- Smoldovskaya, O., Feyzkhanova, G., Arefieva, A., Voloshin, S., Ivashkina, O., Reznikov, Y., Rubina, A. "Allergen extracts and recombinant proteins: Comparison of efficiency of in vitro allergy diagnostics using multiplex assay on a biological microchip" *Allergy Asthma Clin Immunol* (2016), 12, 9.
- Andreeva, N.V., Zatsepina, O.G., Garbuz, D.G., Evgen'ev, M.B., Belyavsky, A.V. "Recombinant HSP70 and mild heat shock stimulate growth of aged mesenchymal stem cells" *Cell Stress Chaperon* (2016), 21, 4, 727 – 733.
- Lezhnin Y.N., Kravchenko D.S., Kravchenko Y.E., Chumakov S.P., Frolova E.I., "Lentivirus-based system for fast expression and purification of recombinant proteins and its implementation for production of human CD44 extracellular part" *Biosci Biotechnol Res Asia* (2015), 12, 3, , 2139 – 2145.
- Savvateeva, L.V., Schwartz, A.M., Gorshkova, L.B., Gorokhovets, N.V., Makarov, V.A., Reddy, V.P., Aliev, G., Zamyatnin, A.A., Jr. "Prophylactic admission of an in vitro reconstructed complexes of human recombinant heat shock proteins and Melanom Antigenic peptides activates anti-melanoma responses in mice" *Curr Mol Med* (2015), 15, 5, 462 – 468.
- Купраш Д.В., Гариб Ф.Ю., Недоспасов С.А. "Антитела и другие рекомбинантные белки как основа препаратов для диагностики и лечения вирусных, аутоиммунных и онкологических заболеваний" *Молекулярная биология* (2017), 51, 6, 883 – 885.
- Мохонов В.В., Шилов Е.С., Корнеев К.В., Атретханы К-С. Н., Горшкова Е.А., Жданова А.А., Василенко Е.А., Горяйнова О.С., Купраш Д.В., Тиллиб С.В., Друцкая М.С., Ефимов Г.А., Недоспасов С.А. "Новые биспецифические белки, связывающие цитокины и поверхностные маркеры миелоидных клеток" *Российский Иммунологический Журнал* (2016), 10 (19), 4, 378 – 385.
- Смирнова О.А., Иванова О.Н., Мухтаров Ф.Ш., Туницкая В.Л., Янсонс Ю., Исагулянц М.Г., Кочетков С.Н., Иванов А.В. "Анализ доменов белков капсида и NS5A вируса гепатита С, активирующих каскад NRF2/ARE" *Acta Naturae* (2016), 8, 3 (30), 134 – 138

Ведущая организация подтверждает, что соискатель и его научный руководитель не являются ее сотрудниками, а также в ведущей организации не ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соисполнителем).



Бочаров А.А.