

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 217.013.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
НАЦИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА КУРЧАТОВСКИЙ
ИНСТИТУТ» (НИЦ «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»-ГОСНИИГЕНЕТИКА) ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело №

решение диссертационного совета от 2 апреля 2019 г. № 24

о присуждении Кульбацкому Дмитрию Сергеевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Структурно-функциональные исследования рекомбинантных аналогов трехпетельных белков человека SLURP1- и SLURP-2» по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» принята к защите 15 января 2019 г., протокол № 23а диссертационным советом Д 217.013.01, созданным на базе НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика (117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1), утвержденного приказом РФ № 105/НК от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Кульбацкий Дмитрий Сергеевич, 1990 года рождения, в 2011 г. окончил бакалавриат и в 2013 г. - магистратуру Московского физико-технического института (МФТИ). В 2013 году соискатель поступил в аспирантуру Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (МГУ) на кафедру биоинженерии по специальности 03.01.02 – «биофизика» и окончил ее в 2017 году. В настоящий момент соискатель работает в должности младшего научного сотрудника в группе биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН).

Диссертация выполнена на кафедре биоинженерии Государственного учебно-научного учреждения Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и в группе биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель - кандидат биологических наук, Люкманова Екатерина Назымовна, руководитель группы биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва

Официальные оппоненты:

Федоров Алексей Николаевич, доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии, заместитель директора по научной работе, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва,

Остроумова Ольга Сергеевна, доктор биологических наук, доцент, руководитель группы моделирования ионных каналов, заместитель директора по научной работе, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, в своем **положительном** отзыве, подписанном членом-корреспондентом РАН, доктором химических наук, профессором, Кочетковым Сергеем Николаевичем, заведующим Лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений в заключении к отзыву указала, что диссертационная работа Кульбацкого Дмитрия Сергеевича «Структурно-функциональные исследования рекомбинантных аналогов белков человека SLURP-1 и SLURP-2», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием по актуальной теме, результаты которой имеют существенное значение для современной молекулярной биологии.

Однако отмечается наличие некоторых недостатков:

В работе присутствуют опечатки и неточности (стр. 11 абзац 1, стр. 49 абзац 1, стр. 59 абзац 3, стр. 88 абзац 1 и т.д.). Также в рисунках 12, 14, 15 не полностью переведены англоязычные подписи, а в рисунках 9 и 10 в литературном обзоре отсутствуют ссылки на источники, в разделе 3.1.3 присутствует ссылка на рисунок 29, который не имеет

отношения к обсуждаемым в данном разделе результатам. В главе «Материалы и методы» указан анализ фосфорилирования ERK1/2 MAP-киназы, который проводился на клетках феохромоцитомы крысы PC12, но результаты с использованием данного метода отсутствуют в тексте диссертации. Указанные замечания не являются принципиальными.

Представленная диссертационная работа по актуальности, научной новизне, фундаментальной и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов, соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученой степени», утвержденного постановлением правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. редакции от 28.08.2017, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Соискатель имеет 16 опубликованных работ по теме диссертации, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 4 работы.

Список научных работ по теме диссертации:

1. Кульбацкий Д.С., Бычков М.Л., Люкманова Е.Н. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы человека: строение, функция и физиологическая роль. Биоорганическая химия, 2018, 44(6), с. 595–607.

2. Lyukmanova E.N., Bychkov M.L., Sharonov G.V., Efremenko A.V., Shulepko M.A., Vasilieva N.A., Kulbatskii D.S., Shenkarev Z.O., Feofanov A.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Human Secreted Proteins SLURP-1 and SLURP-2 Control the Growth of Epithelial Cancer Cells via interaction with Nicotinic Acetylcholine Receptors. Br. J. Pharmacology, 2018, 175, p.1973–1986.

3. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D.S., Bychkov M.L., Kulbatskii D.S., Kasheverov I.E., Astapova M.V., Feofanov A.V., Thomsen M.S., Mikkelsen J.D., Shenkarev Z.O., Tsetlin V.I., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Human Secreted Ly-6/uPAR Related Protein-1 (SLURP-1) Is a Selective Allosteric Antagonist of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. PLoS One, 2016; 11(2):e0149733.

4. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Kulbatskii D.S., Avariniti M., Dolejsi E., Schaer T., Arseniev A.S., Efremov R.G., Thomsen M.S., Dolezal V., Bertrand D., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Secreted Isoform of Human Lynx1 (SLURP-2): Spatial Structure and Pharmacology of

Interactions with Different Types of Acetylcholine Receptors. Scientific Reports, 2016, 6:30698.

На диссертацию и автореферат поступили **положительные** отзывы:

от Шароновой Ирины Николаевны, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории функциональной синаптологии ФГБУН «Научный центр неврологии»

от Семьянова Алексея Васильевича, члена-корреспондента РАН, доктора биологических наук, профессора, руководителя лаборатории внесинаптической передачи, заместителя директора по научной работе ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН»,

от Козлова Сергея Александровича, доктора химических наук, руководителя лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН», в последнем отзыве Козловым С.А. также высказаны замечания к оформлению рисунков, предложено дополнительно исследовать со-локализацию белка rSLURP-1 с рецептором EGF не только с помощью иммуноцитохимических методов, но и с помощью аффинной экстракции магнитными частицами, высказано замечание к выбору типа тканей для аффинной экстракции потенциальных мишеней белков rSLURP-1 и rSLURP-2

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными интересами и достижениями в области молекулярной биологии, структурных и функциональных исследованиях нейрорецепторов и их физиологических функций, позволяющими оценить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Изучена фармакология взаимодействия рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2 с никотиновыми и мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR и mAChR).

Показано, что rSLURP-1 ингибирует пролиферацию нормальных кератиноцитов человека линии Het-1A, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR, при этом, возможно, задействуется метаботропный механизм передачи сигнала через рецептор. Взаимодействие rSLURP-2 с

$\alpha 7$ -nAChR приводит к ингибированию пролиферации Het-1A, а с рецепторами $\alpha 3\beta 2$ -nAChR - к усилению пролиферации Het-1A.

Установлено, что rSLURP-1 и rSLURP-2 ингибируют пролиферацию клеток аденокарциномы кожи, карциномы молочной железы и аденокарциномы кишечника человека. На клетках аденокарциномы кожи линии A431 показано, что антипролиферативный эффект rSLURP-1 обусловлен взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR, а rSLURP-2 с $\alpha 7$ -nAChR и mAChR.

Изучен механизм паракринной/аутокринной регуляции клеток A431 белком SLURP-1. Показано, что добавление rSLURP-1 во внешнюю среду клеток A431 стимулирует секрецию эндогенного SLURP-1 из внутриклеточных депо и снижает экспрессию гена $\alpha 7$ -nAChR и представление активного рецептора на клеточной мембране.

Определена пространственная структура и динамика движений основной цепи молекул rSLURP-1 и rSLURP-2 в растворе, **предложены** модели комплексов rSLURP-2 с внеклеточными доменами $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Определены механизмы взаимодействия рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2 с ацетилхолиновыми рецепторами человека: rSLURP-1 – негативный аллостерический модулятор никотинового рецептора $\alpha 7$ типа, rSLURP-2 – лиганд никотиновых рецепторов $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ типов и мускариновых рецепторов M1 и M3 типов.

Показано, что белки rSLURP-1 и rSLURP-2 обладают пространственной структурой, типичной для трехпетельных белков, но в отличие от трехпетельных токсинов ядов змей обладают аномально высокой подвижностью петлевых участков

Обнаружен механизм положительной обратной связи, регулирующий секрецию эндогенного SLURP-1 в клетках линии A431 при воздействии rSLURP-1. Также установлено, что воздействие rSLURP-1 приводит к снижению уровня экспрессии функционального никотинового рецептора $\alpha 7$ типа на цитоплазматической мембране клеток линии A431.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем что:

Продemonстрирована антипролиферативная активность рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2 в отношении как нормальных кератиноцитов человека, так и опухолевых клеточных линий эпителиального происхождения, причем действующая концентрация rSLURP-1 для некоторых из исследованных опухолевых линий значительно ниже, чем для нормальных кератиноцитов, что говорит о существовании потенциального «терапевтического окна» с точки зрения контроля пролиферации.

Исследованы структурные особенности молекул rSLURP-1 и rSLURP-2, лежащие в основе их специфичности к различным типам ацетилхолиновых рецепторов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ, проведенных в данном исследовании, показана воспроизводимость результатов. Экспериментальные данные были получены на сертифицированном оборудовании. Теоретические положения и выводы, изложенные в диссертационной работе, базируются на современных литературных данных и экспериментальных результатах полученных автором. Анализ экспериментальных данных, полученных на достаточных объемах выборок, свидетельствует о высоком методическом уровне проведенной работы.

Личный вклад соискателя состоит в планировании исследований, выполнении основной экспериментальной работы, обработке, анализе данных и обсуждении полученных результатов. Автор также является основным участником написания статей по результатам данного исследования.

На заседании 2 апреля 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Кульбацкому Д.С. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 11 докторов наук по специальности 03.01.03 –молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 19, против - нет, недействительных – нет.

Председатель диссертационного совета
д.б.н., профессор, академик РАН

Дебабов В.Г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент

Воюшина Т.Л.

Дата составления заключения

04.04.19