

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 20 ноября 2019 года № 20

О присуждении **Люкмановой Екатерине Назымовне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Структурные основы функционального многообразия трехпетельных белков человека и нейротоксинов змей» по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология принята к защите 19 июня 2019 г., протокол № 9 Диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Российская Федерация, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Люкманова Екатерина Назымовна, 1976 г. рождения. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Получение и исследование генно-инженерного нейротоксина II и его мутантных форм» защитила в 2005 году в диссертационном совете Д.217.013.01 при Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов (диплом кандидата наук: серия КТ № 153944). Работает ведущим научным сотрудником группы биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов отдела биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Диссертация выполнена в лаборатории биоинженерии белка и группе биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов отдела биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный консультант - **Кирпичников Михаил Петрович**, академик РАН, доктор биологических наук, заведующий отделом биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Официальные оппоненты:

Кочетков Сергей Николаевич, академик РАН, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Костров Сергей Викторович, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук

Шидловский Юлий Валерьевич, профессор РАН, доктор биологических наук,

заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН), г. Москва, в своем положительном заключении, составленном Хреновой Марией Григорьевной, доктором физико-математических наук, ведущим научным сотрудником, руководителем группы молекулярного моделирования, и утвержденном заместителем директора по научной работе доктором биологических наук Федоровым Алексеем Николаевичем, указала, что по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне диссертация Люкмановой Екатерины Назымовны полностью соответствует требованиям «Положения 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; 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Люкманова Екатерина Назымовна заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03- молекулярная биология.

Соискатель имеет 56 опубликованных работ, из них по теме диссертации опубликовано 30 научных работ (из них – 4 обзора) общим объемом 36 печ.л. в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, кроме того имеется три патента. Соискателем опубликовано 95 работ в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

1. M.L. Bychkov, Z.O. Shenkarev, M.A. Shulepko, O.V. Shlepova, M.P. Kirpichnikov, **E.N. Lyukmanova**. Water-soluble variant of human Lynx1 induces cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells via modulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. PLOS ONE, (2019), 14(5):e0217339.

2. **E.N. Lyukmanova**, M.L. Bychkov, G.V. Sharonov, A.V. Efremenko, M.A. Shulepko, D.S. Kulbatskii, Z.O. Shenkarev, A.V. Feofanov, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. Human secreted proteins SLURP-1 and SLURP-2 control the growth of epithelial cancer cells via interaction with nicotinic acetylcholine receptors. Br. J. Pharmacol. (2018), 175(11):1973-1986.

3. M.A. Shulepko, **E.N. Lyukmanova**, Z.O. Shenkarev, P.V. Dubovskii, M.V. Astapova, A.V. Feofanov, A.S. Arseniev, Y.N. Utkin, M.P. Kirpichnikov, D.A. Dolgikh. Towards universal approach for bacterial production of three-finger Ly6/uPAR proteins: case study of Cytotoxin I from cobra *N. oxiana*. Prot. Exp. Purif. (2017), 130:13-20.

4. **E.N. Lyukmanova**, M.A. Shulepko, M.L. Bychkov, Z.O. Shenkarev, A.S. Paramonov, A.O. Chugunov, D.S. Kulbatskii, M. Avarinidi, Stefany, V. Dolezal, A.S. Arseniev, R.G. Efremov, M.S. Thomsen, D. Bertrand, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. Secreted isoform of human Lynx1 (SLURP-2): spatial structure and pharmacology of interactions with different types of acetylcholine receptors. Scientific Reports. (2016), 6:30698.

5. M.S. Thomsen, M. Arvaniti, M.M. Jensen, M.A. Shulepko, D.A. Dolgikh, L.H. Pinborg, W. Härtig, **E.N. Lyukmanova**, J.D. Mikkelsen. Lynx1 and A β 1-42 bind competitively to multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes, Neurobiology of Aging (2016), 46:13-21.

6. **E.N. Lyukmanova**, M.A. Shulepko, Z.O. Shenkarev, I.E. Kasheverov, A.O. Chugunov, D.S. Kulbatskii, M.Y. Myshkin, Y.N. Utkin, R.G. Efremov, V.I. Tsetlin, A.S. Arseniev, M.P. Kirpichnikov, D.A. Dolgikh. Central loop of non-conventional toxin WTX from *Naja kaouthia* is important for interaction with nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*. (2016), 119:274-279.

7. **E.N. Lyukmanova**, M.A. Shulepko, D. Kudryavtsev, M.L. Bychkov, D.S. Kulbatskii, I.E. Kasheverov, M.V. Astapova, A.V. Feofanov, M.S. Thomsen, J.D. Mikkelsen, Z.O. Shenkarev, V.I. Tsetlin, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. 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.

8. **E.N. Lyukmanova**, Z.O. Shenkarev, M.A. Shulepko, A.S. Paramonov, A.O. Chugunov, H. Janickova, E. Dolejsi, V. Dolezal, Y.N. Utkin, V.I. Tsetlin, A.S. Arseniev, R.G. Efremov, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. Structural insight into specificity of interactions between non-conventional three-Finger toxin WTX and muscarinic acetylcholine receptors. (2015), *J. Biol. Chem.* (2015), 290(39):23616–23630.

9. **E.N. Lyukmanova**, M.A. Shulepko, S.L. Buldakova, I.E. Kasheverov, Z.O. Shenkarev, R.V. Reshetnikov, S.Y. Filkin, D.S. Kudryavtsev, L.O. Ojomoko, E.V. Kryukova, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov, P.D. Bregestovski, V.I. Tsetlin. Ws-LYNX1 residues important for interaction with muscle-type and/or neuronal nicotinic receptors. *J. Biol. Chem.* (2013), 288(22):15888-15899.

10. **E.N. Lyukmanova**, Z.O. Shenkarev, M.A. Shulepko, K.S. Mineev, D. D'Hoedt, I.E. Kasheverov, S. Filkin, H. Janickova, V. Dolezal, D.A. Dolgikh, A.S. Arseniev, D. Bertrand, V.I. Tsetlin, M.P. Kirpichnikov. NMR structure and action on nicotinic acetylcholine receptors of water-soluble domain of human lynx1. *J. Biol. Chem.* (2011), 286:10618-10627.

11. D. Lesovoy, E. Bocharov, **E. Lyukmanova**, Yu. Kosinsky, M. Shulepko, D. Dolgikh, M. Kirpichnikov, R. Efremov, A. Arseniev. Specific membrane binding of neurotoxin II can facilitate its delivery to acetylcholine receptor. *Biophys. J.*, (2009), 97:2089-2097.

12. **E.N. Lyukmanova**, Z.O. Shenkarev, A.A. Schulga, Y.S. Ermolyuk, D.Y. Mordvintsev, Y.N. Utkin, M.A. Shoulepko, R.C. Hogg, D. Bertrand, D.A. Dolgikh, V.I. Tsetlin, M.P. Kirpichnikov. Bacterial expression, NMR, and electrophysiology analysis of chimeric short/long-chain alpha-neurotoxins acting on neuronal nicotinic receptors. *J. Biol. Chem.* (2007), 282:24784-24791.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента Кочеткова С.Н., отзыв положительный, содержит следующие замечания: Местами встречается научный жаргонизм, вместо слова «фолд» уместнее было бы использование русских слов «укладка» или «структура». В диссертационной работе присутствует небольшое количество опечаток, например, на странице 205, вторая строка сверху два раза подряд написано слово «что». Во второй части раздела «Результаты и обсуждение» можно было бы обсудить возможное наличие мембраносвязывающих сайтов и у других трехпетельных нейротоксинов, а также трехпетельных белков человека. Не лишним было бы обсуждение потенциального участка молекулы SLURP-1, важного для проявления его антипролиферативной активности, хотя бы опираясь на литературные данные по точечным мутациям, приводящим к развитию кожных заболеваний.

2. Отзыв официального оппонента Кострова С.В., отзыв положительный, содержит следующие замечания: Автором не раскрыта тема активных сайтов в молекулах SLURP-1 и SLURP-2, и не совсем ясен механизм, по которому Lynx1 влияет на синаптическую пластичность. В тексте диссертации некоторые рецепторы обозначены в английском написании, другие русскими буквами, присутствуют орфографические и грамматические ошибки.

3. Отзыв официального оппонента Шидловского Ю.В., отзыв положительный, содержит следующие замечания: В работе показано, что в раковых клетках под действием SLURP-1 и Lynx1 активируется ряд транскрипционных факторов, происходит изменение экспрессии генов и меняются концентрации эндогенных альфа7 никотинового рецептора и SLURP-1. Однако изменение экспрессии генов в мозге модельных животных под действием Lynx1 не изучено. Более того, в тексте несколько раз высказывается предположение о том, что увеличение синаптической пластичности под действием Lynx1 связано с потенцированием альфа7 никотинового рецептора. Не может ли реализовываться более сложная связь, когда под воздействием Lynx1 происходит изменение экспрессии генов факторов или рецепторов, влияющих на синаптическую пластичность? Для SLURP-1 показано, что в раковых клетках под его действием активируются внутриклеточные сигнальные каскады по метаболитному механизму в результате взаимодействия альфа7 никотинового рецептора с G-белками. А что происходит в случае воздействия Lynx1 на раковые клетки легкого? По какому механизму, ионотропному или метаболитному происходит активация сигнальных каскадов при взаимодействии Lynx1 с альфа7-рецептором в раковых клетках?

4. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит следующие замечания: работа не лишена ряда недостатков, к которым можно отнести опечатки, пунктуационные ошибки и использование англицизмов и научного жаргона. Например: стр. 107 «Выход нейротоксина в этой работе...»; стр. 160, рисунок Log[концентрация] вместо Log[лиганд]; написание названий микроорганизмов следует писать курсивом; стр. 176 из словосочетания «*in vitro*» пропало «*vitro*»; по тексту несколько раз встречается слово «фолд».

5. Отзыв на автореферат заведующего лабораторией физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля, академика РАН, д.б.н., проф. Островского М.А. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

6. Отзыв на автореферат заведующего лабораторией функциональной синаптологии отдела исследований мозга Федерального государственного бюджетного учреждения науки Научный центр неврологии, член-корреспондента РАН, д.б.н., проф. Скребицкого В.Г. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

7. Отзыв на автореферат главного научного сотрудника лаборатории химии и физики липидов Центра изучения молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, заведующего кафедрой биофизики Московского физико-технического института (Национальный исследовательский университет), д.х.н., проф. Чупина В.В. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

8. Отзыв на автореферат доцента кафедры биоинженерии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, профессора РАН, д.б.н. Соколовой О.С. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих теме представленной диссертации. Это подтверждается наличием у них значительного количества публикаций в ведущих российских и международных научных журналах и изданиях. Стоит отметить, что

сотрудниками ФИЦ Биотехнологии РАН ведутся работы по проведению фундаментальных исследований в области биоинженерии и генетической инженерии, системной и структурной биологии, получению новых биоактивных субстанций, а также исследованию различных нейродегенеративных заболеваний. Академик РАН Кочетков С.Н. является одним из ведущих специалистов в области физико-химической биологии, биохимии и молекулярной биологии. Член-корр. РАН Костров С.В. – ведущий специалист в области фундаментальных основ биотехнологии, биохимии и белковой инженерии. Профессор Шидловский Ю.В. является признанным специалистом в области изучения транскрипции и экспрессии генов. Наличие солидного опыта и высокой квалификации в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований соискателю удалось совершить ряд открытий в молекулярной биологии: (1) впервые определены пространственные структуры нейротоксина WTX из яда *Naja kaouthia* и четырех белков человека Lynx1, Lypd6, SLURP-1 и SLURP-2 и предложены модели комплексов этих белков с лиганд-связывающим доменом никотинового ацетилхолинового рецептора; (2) обнаружены новые мишени действия Lynx1, Lypd6 и SLURP-2; (3) впервые определены участки молекул нейротоксина II, нейротоксина WTX и Lynx1, важные для взаимодействия с их мишенями; (4) впервые продемонстрирована антипролиферативная активность белков SLURP-1 и SLURP-2 по отношению к раковым клеткам эпителия; (5) впервые предложены механизмы, лежащие в основе антираковой активности SLURP-1 и SLURP-2; (6) впервые показано, что водорастворимый аналог Lynx1 конкурирует с бета-амилоидным пептидом (1-42) за связывание с никотиновым ацетилхолиновым рецептором и может уменьшать токсичное действие пептида; (7) впервые показано, что водорастворимый аналог Lynx1 может компенсировать ухудшение когнитивной функции, вызванное подавлением холинергической системы мозга, а также амилоидозом. Таким образом, диссертация Люкмановой Е.Н. является важным научным исследованием, вносит существенный вклад в развитие знания о роли никотинового ацетилхолинового рецептора и трехпетельных белков человека в функционировании организма человека, а также имеет большое практическое значение для будущих разработок инновационных препаратов для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, результаты воспроизводимы в различных условиях, а методы исследования, предложенные и разработанные соискателем, прошли независимую экспериментальную проверку.

Личный вклад соискателя состоит в том, что он принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов. Весь экспериментальный материал получен лично автором и руководимыми им сотрудниками группы, аспирантами, студентами, а также членами временных трудовых коллективов, создаваемых для выполнения исследований под руководством соискателя. Кроме того, исследование активности трехпетельных белков на ооцитах *X. laevis* проводилось в лабораториях под руководством чл.-корр. РАН В.И. Цетлина (ИБХ РАН), проф. Д. Бетрана (Женева), проф. П. Бреджестовского (Университет Aix-

Marseille) и проф. С.А. Козлова (ИБХ РАН); исследование активности трехпетельных белков по отношению к мускариновым рецепторам проводилось в лаборатории под руководством проф. В. Долежал (Институт физиологии, Прага); исследование активности трехпетельных белков на срезах мозга грызунов проводилось в ИВНД РАН под руководством чл.-корр. РАН П.М. Балабана, в Центре неврологии под руководством чл.-корр. РАН В.Г. Скребицкого и в ННГУ под руководством чл.-корр. РАН А.В. Семьянова; исследование экспрессии Lynx1 в мозге грызунов и человека проводилось в лаборатории под руководством проф. М.С. Томсена (Университет Копенгагена); исследование влияния Lynx1 на синаптическую плотность и образование амилоидных бляшек проводилось в открытой лаборатории по нейрофизиологии КФУ под руководством к.б.н. К.А. Петрова; поведенческие тесты проводились на кафедре физиологии человека и животных МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством А.А. Андреева-Андриевского; структурные исследования трехпетельных белков проводились в Отделе структурной биологии ИБХ РАН под руководством проф. А.С. Арсеньева. Анализ полученных данных, а также подготовка научных публикаций и патентов выполнены лично или при активном участии автора.

На заседании 20 ноября 2019 г. диссертационный совет принял решение присудить Люкмановой Екатерине Назымовне ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 6 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации (03.01.03 – Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени - 21, против присуждения ученой степени - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя
диссертационного совета
доктор физ.-мат.наук

Ефремов Роман Гербертович

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физ.-мат.наук



Олейников Владимир Александрович

21 ноября 2019 г.