

В диссертационный совет МГУ.03.12

при Биологическом факультете

МГУ имени М.В. Ломоносова

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Цой Татьяны Дмитриевны «Структурно-функциональные особенности лимфоцитарного фосфатазо-ассоциированного фосфопротеина LPAP» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.03. – «Иммунология».

Актуальность темы выполненной работы

Работа Т.Д. Цой относится к исследованиям механизмов проведения сигналов и возможностью их регуляции. Это фундаментальное направление исследований имеет также практическое значение для выяснения биологии развития заболеваний человека. Белок LPAP, изучаемый в данной работе, ассоциирован с важной для иммунного ответа трансмембранной тирозиновой фосфатазой CD45 (ген PTPRC), которая участвует в Т-клеточном сигналинге. При изучении комплексов фосфатазы CD45 с различными белками и был выделен белок с неизвестной функцией, который получил название LPAP (лимфоцитарный фосфатазо-ассоциированный фосфопротеин). Белок был открыт в 90-е годы, однако данных о его структуре и функциях до начала работы автора было очень мало. Результаты, полученные Т.Д. Цой в диссертационной работе, являются значительным продвижением в направлении изучения белка LPAP, а полученные в работе фосфоспецифические антитела – эффективным инструментом для дальнейшего исследования белка и его фосфорилирования. Актуальность работы не вызывает сомнений.

Оценка новизны и научно-практической значимости работы

Работа представляется новой, надежной и проведенной на высоком методологическом уровне. Использование всех методов обосновано и не вызывает сомнений, так же, как и интерпретация результатов. Выводы соответствуют задачам и имеют четкое обоснование. Новые данные, полученные Т.Д. Цой, позволяют значительно продвинуться в изучении функций белка LPAR и его места в клеточном сигналинге. Это открывает новые перспективы в поиске возможностей управления развитием иммунитета, T-сигналинга, в частности.

Достоверность и обоснованность полученных результатов

Достоверность полученных Т.Д. Цой результатов обеспечена использованием современных методов, тщательным анализом полученных данных и корректными способами их математической обработки. Выводы базируются на полученных результатах, а содержание автореферата полностью отражает основные результаты и выводы диссертационной работы. Результаты данной работы были апробированы на отечественных и международных конференциях, также по теме работы были опубликованы четыре статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Т.Д. Цой построена по традиционной схеме и содержит следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение и выводы, Список литературы. Объем диссертации составляет 140 страниц, содержит 36 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 165 ссылок.

Во **Введении** автор кратко описывает основные сведения о фосфопротеине LPAR, ставит цели и задачи работы, констатирует практическую и теоретическую ценность данной работы и ее научную новизну.

В разделе **Обзор литературы** приведены общие сведения о фосфорилировании белков. Сначала описываются химические и физические свойства фосфора и элементов, близких к нему по периодической таблице Менделеева, затем обсуждаются белки, осуществляющие фосфорилирование и дефосфорилирование, роль данного процесса в клетках и в заключение обсуждается участие киназ и фосфатаз при передаче сигнала через T-клеточный рецептор. Значительное внимание в обзоре литературы уделено фосфатазе CD45. Автор приводит подробные сведения о структуре фосфатазы, её функциях и взаимодействии с другими белками, киназами Lck и Fyn. Татьяна Дмитриевна суммирует известную на данный момент информацию о CD45-ассоциированном белке LPAR, уделяя внимание его строению и влиянию нокаута гена белка. Последней раздел Обзора литературы сосредоточен на протеинкиназе CK2. В ходе диссертационной работы было установлено, что белок LPAR является еще одним субстратом данной киназы, поэтому автор справедливо уделит внимание структуре и функциям CK2 в различных клеточных процессах. Из раздела Обзор литературы логично следует постановка цели и задач исследования.

Глава **Материалы и методы** содержит достаточно подробную информацию о методах работы, что позволяет в дальнейшем использовать эту главу как рабочие протоколы. В данном разделе описан дизайн различных мутантов LPAR, получение рекомбинантного LPAR при экспрессии в *E.coli*, создание клеточной линии СЕМ с нокаутом LPAR, а также временных и стабильных трансдуцентов LPAR, получение моноклональных фосфоспецифических антител. Подробно описываются разнообразные методы, такие как проточная цитометрия, клеточный сортинг, иммунопреципитация, иммуноферментный анализ, иммуногистохимия, конфокальная микроскопия, одномерный и двумерный белковый электрофорез, Вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия, киназные тесты *in vitro* и *in vivo* и многое другое.

В рамках поставленных задач, Т.Д. Цой предстояло определить эпитопы белка LPAR, что благополучно удалось сделать (материалы представлены в разделе **Результаты**). В лаборатории впервые были получены моноклональные антитела против белка LPAR. С их помощью удалось идентифицировать три антигенных эпитопа белка. Показано, что трансмембранный белок LPAR экспонирован во внеклеточную среду минимальным образом. Проанализирована экспрессия LPAR на различных типах клеточных линий.

С помощью 2D-DIGE электрофореза показано, что LPAR из лимфоидных клеток СЕМ существует в виде 7 протеоформ, которые различаются степенью фосфорилирования. Ранее в литературе было показано наличие только 4 протеоформ белка. Для определения сайтов фосфорилирования, с помощью сайт-специфического мутагенеза были получены точечные и укороченные мутантные формы белка LPAR. На основании результатов с фосфоспецифическим красителем Pro-Q было показано, что одним из сайтов фосфорилирования является Ser-153. С помощью электрофореза с Phos-tag, реагентом, образующим хелатные комплексы с фосфатными группами, было показано, что еще одним сайтом фосфорилирования является Ser-99. При движении в 18% SDS-электрофорезе, белок LPAR представлен двумя полосами. В случае мутации по сайту Ser-172 нижняя полоса исчезает, что свидетельствует о том, что фосфорилирование по данному сайту приводит к изменению электрофоретической подвижности. Все 3 сайта фосфорилирования белка были подтверждены с помощью масс-спектрометрии, а позже с помощью фосфоспецифических антител. Татьяной Дмитриевной проведена большая работа по их получению и тестированию. С помощью фосфоспецифических антител были проанализированы фосфоформы белка LPAR при экспрессии в различных клеточных линиях. Показано явное упрощение характера фосфорилирования LPAR при экзогенной экспрессии в нелимфоидных клеточных линиях по сравнению с фосфорилированием белка по всем трем

сайтам при экспрессии в лимфоидных клетках. На основании данного результата делается предположение о важности белков-партнеров для полноценного фосфорилирования LPAR, что также может косвенно свидетельствовать о значении белка для лимфоцитов.

В последнем разделе Результаты показано, что белок LPAR является субстратом протеинкиназы СК2. Данное взаимодействие подтверждено как *in vitro*, так и *in vivo* с использованием фосфоспецифического моноклонального антитела, что неопровержимо доказывает фосфорилирование LPAR протеинкиназой СК2 по серину 153.

Замечания к диссертации следующие.

- На рис. 1 (литературный обзор) показана ситуация, когда фосфорилирование белка дает возможность связаться с другим белком через Р-группу, а разве не бывает других ситуаций? Когда для формирования сайта посадки второго белка достаточно, что изменилась конформация первого?
- Пространные рассуждения в литературном обзоре о том, почему именно фосфор, а не сера, или мышьяк используются для сигналинга приносят в текст избыточную информацию и расфокусируют внимание читателя.
- Стр. 16 «...регулировать процесс трансдукции сигнала» - лучше использовать слово «передача»? Можно, конечно, разделять передачу сигнала от трансдукции, как процесса превращения одного вида сигнала в другой (либо уже в конечный результат, ответ), но везде, где имеется просто информация о процессах передачи сигнала – лучше использовать по сути более точное и понятное слово «передача».
- Стр. 17 раздел «1.1.4 Фосфорилирование и рак» (литературный обзор) кажется избыточным, поскольку не исследуется далее в работе.
- (стр. 43, Материалы и методы) - не указано, откуда брали клеточные линии и бактерии.

- Стр. 49 (Материалы и методы) написано: «Клетки трансфецировали 1 мкг плазмидной ДНК с помощью 2 мкл трансфекционного реагента Lipofectamin (Invitrogen)». В данном случае надо указывать какие концентрации липофектамина / плазмидной ДНК были использованы.
- Не пропорционально по детализации описаны методы. Например, 3,5 страницы отведено описанию ПЦР с детальным указанием смеси всех буферов, температурным программам, контролями всему остальному, при этом разделу «Конфокальная микроскопия» отведено треть страницы, и описано все очень кратко.
- Стр. 91 переваривание пепсином – это жаргон, с биохимической точки зрения правильнее писать протеолиз, гидролиз белков, поскольку пепсин является эндопептидазой, т.е. ферментом.
- Список сокращений приведен в конце, хотя удобнее для читателя более традиционный способ, в начале работы.
- Введение написано лаконично и по сути, однако фраза в конце «Мы надеемся, что эта информация поможет в установлении структуры и функций белка LPAR» носит эмоциональный характер и при этом косвенно снижает ценность работы в глазах читателя, поскольку именно установлением структуры и функции белка посвящена работа.
- Имеются стилистические ошибки, например, «лизировали в буфере лизиса» (стр. 49).

Изложенные замечания имеют рекомендательный характер, не указывают на принципиальные ошибки и не подвергают сомнению достоверность полученных результатов.

Работа отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова для диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.03 - "Иммунология" (по

биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Соискатель Цой Татьяна Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.03 - "Иммунология".

Официальный оппонент:

Д.х.н., ведущий научный сотрудник отдела биокинетики

Научно-исследовательского института

физико-химической биологии имени А.Н.

Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

СЕРГЕЕВА Марина Глебовна

«09» ноября 2018 г.

Контактные данные:

тел.: +7(495)9394332, e-mail: sergeeva@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.04 – биохимия

Адрес места работы: 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40,

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

тел.: +7(495)9395359; e-mail: fxb@genebee.msu.ru

Подпись сотрудника

НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ

М.Г. Сергеевой удостоверяю:

