ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Скоробогатова Олександра Юрійовича

«Вивчення структурних механізмів взаємодії дефосфорильованих 2'-5'-триаденілатів з білком S100A1»,

поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Актуальність теми дисертації. Активація інтерферону є одним із основних клітинних сигнальних шляхів, що викликає відгук імуної системи людини на зовнішню інфекцію, особливо на віруси. Відомо, що одним із шляхів, залежних від активації інтерферон-залежного сигналінгу є олігоаденілатний шлях, в якому функціонально індукований фермент 2'-5'-олігоаденілатсинтетаза бере участь в реакції синтезу олігоаденілатів, а саме 2'-5'-олігоAn (n=2-6), які далі активують латентну РНКазу L, яка гідролізує вірусні та клітинні матричні РНК. Показано, що в вищеописану реакцію вступають тільки фосфорильовані олігоаденілати. Відомо, що у клітині містяться також дефосфорильовані олігоаденілати, проте їх функцію ще не розкрито.

Раніше співробітниками лабораторії було продемонстровано, що дефосфорильованому триаденілату (2'-5'-A3) притамані окремі від вищевказаних антивірусні властивості, наприклад, природній 2'-5'-A3 та його хімічно модифіковані аналоги інгібують ряд вірусних рестриктаз, таких, як EcoRI, внаслідок чого 2'-5'-A3 проявляє імуностимулюючу активність.

Важливо відзначити, що природній 2'-5'-A3 та його епоксі-модифікований аналог 2'-5'-A3-epo впливають на процес скорочення судин гладеньких м’язів *in vivo*. Одним із логічних пояснень такої функції олігоаденілатів може бути їх взаємодія з білками, які беруть участь у контролі скорочення м’язів, а саме з кальмодуліном (Calmodulin, CaM) та S100A1, що

було продемонстровано раніше у даній лабораторії для СаМ. Більше того, така взаємодія призводить до змін у зв'язуванні СаМ та іонів $Ca2^+$.

Можна припустити, що олігоаденілати взаємодіють і з протеїном S100A1, який є антагоністом СаМ і також здатен зв'язувати іони $Ca2^+$.

Вищеописане вказує на те, що вивчення молекулярних механізмів взаємодії олігоаденілатів із антагоністом СаМ є важливою і актуальною задачею фундаментальних досліджень сучасної молекулярної біології з метою експериментального обгрунтування нових підходів для стимулювання імунної системи людини та майбутньої розробки методів індивідуалізованої терапії.

Дисертаційна робота Скоробогатова О.Ю. присвячена саме цій проблемі – дослідженню структурних та функціональних змін протеїна S100A1 при взаємодії з природнім олігоаденілатом 2′-5′-A_3.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в групі молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу відповідно до плану науково-дослідних робіт Інституту молекулярної біології і генетики НАН України 2.2.4.15 «Вивчення механізму взаємодії 2',5' - олігоаденілатів з кальцій-зв'язуючими білками» (2009-2013), номер державної реєстрації 0108U008528; «Розробка та впровадження методів діагностики та експресії генів» (2013), номер державної реєстрації 0114U001100; 2.2.4.15 «Вивчення впливу олігонуклеотидів на сигнальні білки та експресію генів вродженого імунітету» (2018), номер державної реєстрації 0113U002779..

Достовірність та ступінь обгрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Метою роботи було дослідження структурних та функціональних зміни білка S100A1 при взаємодії з 2′-5′-A3. Мету роботи повністю розкривають поставлені задачі.

Робота виконана на препаратах рекомбінантних протеїнів S100A1, S100B, СаМ, а також природного та епосі-модифікованого поліаденілатів 2′-5′-A3.

Дисертант застосував сучасні методи дослідження, включаючи мікробіологічні (культивування бактеріальних клітин), молекулярно-біологічні (створення конструктів), біохімічні (білковий гель-електрофорез), спектральні (спектроскопія кругового дихроїзму, флуоресцентна спектроскопія, інфрачервона спектроскопія із перетворенням Фур'є, спектрометрія ядерного магнітного резонансу, метод малокутового рентгенівського розсіювання), що дозволило отримати результати, які мають не тільки наукову новизну, а і практичне значення.

Статистична обробка матеріалу здійснена з використанням тестів Уїлкоксона і Манн-Уітні для непараметричних даних.

Достовірність наукових положень, висновків і практичних рекомендацій дисертаційної роботи обґрунтовано вдало обраним комплексом методологічних підходів для досягнення поставленої мети та вирішення завдань дослідження.

Новизна та практичне значення одержаних результатів. Наукова новизна результатів дисертації Скоробогатова О.Ю. полягає у тому, що вперше було показано взаємодію 2′-5′-А3 з рядом білків, а саме-Ca^{2+}-зв'язуючими протеїнами родини S100, CaM та протеїнкіназою Аврора. Показано, що така взаємодія призводить не тільки до змін вторинної структури досліджених білків, але й до модифікації їх активності. Так, було продемонстровано, що утворення комплексу між 2′-5′-А3 і S100A1 призводить до кількісних змін складу елементів вторинної структури останнього: зменшується відсоток альфа-спіральних елементів та збільшується кількість невпорядкованих елементів вторинної структури. Також встановлено, що 2'-5'-триаденілати змінюють афінність S100A1 до іонів Ca^{2+}. Більше того, було визначено, які амінокислотні залишки у послідовності протеїна S100A1 безпосередньо взаємодіють із 2'-5'-триаденілатом.

Автором було запропонувано механізм стимулювання скорочення м'язів при дії 2'-5'-триаденілатів *in vivo*, який заключається у прямій взаємодії 2'-5'-триаденілатів із протеїном S100A1, викликаючи у складі останнього

структурні та функціональні зміни, що впливає на подальшу взаємодію протеїну S100A1 з ріанодиновим рецептором.

Практична значимість роботи полягає в тому, що отримані автором результати стосовно прямої взаємодії 2'-5'-триаденілатів із протеїном S100A1, внаслідок чого модифікується взаємодія між S100A1 і ріанодиновим рецептором, є фундаментальною основою для майбутнього пошуку потенційних мішеней впливу і створення нових противірусних препаратів.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях. Основні положення та результати дисертації повністю висвітлені у 11 наукових роботах - 5 статтях у наукових фахових журналах та у тезах 6 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій - на XII українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019), IX Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukraine, 2015), Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukriane, 2015), VII Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukaine, 2014), VII Conference of Young Scientist (Kyiv, Ukirane, 2013), Young Scientists Forum FEBS (Saint Petersburg, Russia, 2013). Основний зміст дисертаційної роботи повністю відображено в опублікованих наукових працях.

Оцінка змісту дисертації та автореферату. Дисертація загальним обсягом 128 сторінки оформлена із дотриманням існуючих правил, побудована за традиційною схемою, складається з вступу, огляду літератури, розділів Матеріали та методи досліджень, Результати досліджень та обговорення (у дев'яти частинах), Аналіз та узагальнення результатів дослідження та Висновків. Список використаних джерел містить 195 найменувань. Текст супроводжується 28 рисунками і 4 таблицями.

У вступі автор ґрунтовно означив актуальність обраної теми, сформулював мету і задачі, розкрив її наукову новизну і практичне значення.

Огляд літератури структурований і складається із 2-х підрозділів, кожний із яких має 7 частин, у яких автор проаналізув більшість вагомих літературних першоджерел за темою дослідження; у першому підрозділі описано загальні біологічні функції 2'-5' олігоаденілатів, в другому підрозділі

– детально проаналізовано $Ca2^+$-зв'язуючі білки; наголошується, що ключову роль у взаємодії із іонами $Ca2^+$ відіграє EF-мотив. Також обговорені такі протеїни, як CaM та білки родини S100. Водночас автор демонструє обізнаність щодо особливостей регуляції судинного тонусу за допомогою препаратів олігоаденілатів 2'-5'-A3 та можливого застосування білків сімейства S100 в якості терапевтичних мішеней в клінічній практиці. В цілому в досить короткому розділі було проаналізовано більшість вагомих наукових джерел за останніх 5 – 10 років. Огляд літератури доволі змістовний, логічно побудований, аргументовано викладений.

У **другому розділі «Матеріали та методи досліджень»** автор детально описав застосовані методи та оцінку результатів дослідження, використаних при вивченні взаємодії білків. Так, обгрунтовано використання сучасних фізико-хімічних методів, за допомогою яких показано взаємодію 2′-5′-A3 із Ca^{2+}-зв'язуючими протеїнами родини S100, CaM та протеїнкіназою Аврора, а також зміни вторинної структури досліджених білків і модифікація їх активності. Математичне моделювання було застосовано для визначення амінокислотних залишків у послідовності протеїна S100A1, які безпосередньо взаємодіють із 2'-5'-триаденілатом.

Загалом, алгоритм дослідження є вдалим та цілком виправдовує поставлену мету.

У третьому розділі «Результати досліджень та обговорення» у дев'яти підрозділах викладено результати власних досліджень, який є найбільш фундаментальним з точки зору залучення сучасних молекулярно-біологічних методів та демонструє оволодіння дисертантом усіма сучасними молекулярно-біологічними і фізико-хімічними методами, вміння глобального аналізу ориманого експериментального матеріалу.

В першому підрозділі описується процес синтезу та очистки рекомбінантного білка S100A1. Можливо, більшість цього розділу було б доцільно перенести у другий розділ, «Матеріали і методи». Проте це зауваження не змінює позитивну оцінку роботи. У другому, третьому,

четвертому і п'ятому підрозділах автор описує вивчення впливу олігоаденілатів 2'-5'-А3 та 2'-5'-А3-еро на константу дісоціації між протеїном S100A1 та іонами Ca^{2+}, на відсотковий склад елементів вторинної структури протеїна S100A1, на вторинну структуру в цілому білків S100A1 та CaM методами спектрометрії ЯМР та інфрачервоної спектроскопії із перетворенням Фур'є. Так, автором встановлено, що олігоаденілати знижують спорідненість протеїна S100A1 до іонів Ca^{2+}, причому у вторинній структурі цього білка спостерігається зменшення відсоткового складу альфа-спіральних елементів. Більше того, олігоаденілати викликали перебудови в межах бета-структурних елементів, хоча і незначні, як у S100A1, так і в CaM. У шостому розділі запропоновано схему взаємодії S100A1 з 2'-5'-А3 за допомогою математичного комп'ютерного моделювання, яке підтвердило дані, отримані при використуванні спектрометрії ЯМР: PO_2- група 2-ого залишку АМФ та С=О група Вал69 взаємодіють електростатично. Вал69 входить до С-термінусу Ca^{2+}-зв'язуючого домену протеїна S100A1, і при взаємодії з лігандом змінюється третична структура протеїна. У сьомому підрозділі автор показав, що олігоаденілати 2'-5'-A_3 та 2'-5'-A_3-еро впливають на активність протеїнкінази Аврора, що дозволяє припустити можливі зміни у сигнальних шляхах клітини. У восьмому підрозділі показано, що 2'-5'-А3-еро може впливати на третичну структуру протеїна EGFP, яка представляє собою в основному бета-складчасті елементи. У дев'ятому підрозділі отримано дані по змінах температур плавлення, середнього розміру часток та поверхневого заряду препарату «Nuclex».

В четвертому розділі «Аналіз та узагальнення результатів» дисертаційної роботи проведено аналіз отриманих результатів. Автор, інтегруючи результати власних досліджень, зводить їх у єдину систему, зіставляє із даними літератури, а також висловлює власні міркування з приводу механізму стимулювання скорочення м'язів при дії 2'-5'-триаденілатів *in vivo* за рахунок прямої взаємодії 2'-5'-триаденілатів із протеїном S100A1, що викликає у складі останнього структурні та

функціональні зміни, які впливають на подальшу взаємодію протеїну S100A1 з ріанодиновим рецептором. У цьому розділі автор надає можливість у цілому охопити масштабну наукову роботу, простежити за умотивованою послідовністю реалізованих дослідницьких кроків, усвідомити основні положення, їх інтерпретацію та з'ясувати зв'язок з наступними висновками, які сформульовано в 7 пунктах, які повністю відповідають меті, задачам та результатам проведеного дослідження. Вірогідність одержаних результатів підтверджена їх адекватною статистичною обробкою.

В авторефераті з оптимальною повнотою відображено зміст усіх розділів дисертації, її наукові положення і висновки, а його зміст беззаперечно відповідає змісту дисертації.

В дисертації мають місце окремі орфографічні та стилістичні помилки, які, втім, не перешкоджають адекватному сприйняттю результатів роботи, не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи у розв'язанні важливого наукового завдання щодо дослідження структурних та функціональних зміни білка S100A1 при взаємодії з 2′-5′-A3.

Втім, для з'ясування можливості застосування результатів дослідження для обґрунтування нових підходів пошуку потенційних мішеней впливу і створення нових противірусних препаратів виникло кілька запитань:

1. Стосовно використання EGFP в якості моделі протеїнів, які містять в своїй структурі в основному бета-складчасті елементи, які інші доступні протеїни ви б могли використати в своїй роботі?

2. Стосовно рис. 3.17 і 3.18, які можна зробити висновки на основі флуоресцентної спектроскопії по змінам у третичній структурі протеїна?

2. Стосовно препарату «Nuclex», чи відомо, який точно склад цього препарату? В роботі проведено аналіз середнього розміру часток, температура плавлення і поверхневий заряд. Проте не повністю зрозуміла логіка переходу від вищевказаних олігоаденілатів до препарату «Nuclex», враховуючи невстановлений склад цього препарату. Також виникає питання, яку долю складають олігоаденілати у препараті «Nuclex»?

Таким чином, дисертація Скоробогатова О.Ю. є закінченим науковим дослідженням із експериментальним обгрунтуванням перспективи дослідження структурних та функціональних зміни білка S100A1 при взаємодії з 2′-5′-А3 як фундаментальної основи для майбутньої розробки антивірусних препаратів.

Висновок

Дисертація Скоробогатова Олександра Юрійовича «Вивчення структурних механізмів взаємодії дефосфорильованих 2′-5′-триаденілатів з білком S100A1» є закінченим, самостійно виконаним науковим дослідженням, яке присвячене експериментальному обгрунтуванню дослідження структурних та функціональних зміни білка S100A1 при взаємодії з 2′-5′-А3 як фундаментальної основи для майбутньої розробки антивірусних препаратів.

Дисертація відповідає вимогам п. 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент
Завідувачка лабораторії молекулярних
механізмів трансформації клітини
Інституту експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є Кавецького
НАН України
доктор біологічних наук О.В. Кашуба

СЛУЖБА КАДРІВ

Підпис О.В. Кашуба
ЗАСВІДЧУЮ

ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р.Є. Кавецького
Ідентифікаційний код 05416946