

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Якуповой Эльмиры Ильдаровны на тему «Исследование структурных изменений в гладкомышечном титине при формировании агрегатов *in vitro*», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Агрегация белков, функциональная либо вызывающая различной тяжести патологии, является одной из тем, число научно-исследовательских и клинических публикаций по которой стремительно растёт. Это обусловлено, главным образом, увеличивающейся частотой таких заболеваний, связанных с образованием белковых агрегатов, или амилоидов, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабет II типа и ряд системных амилоидозов. К исследованиям привлекаются новые экспериментальные методики и техники. Однако механизмы образования патологических амилоидных агрегатов в живом организме до сих пор не ясны. В связи с этим представляется актуальным исследовать свойства белков, способных к амилоидной или амилоидо-подобной агрегации, *in vitro*. Одним из таких белков является титин – гигантский белок, присутствующий в клетках поперечно-полосатых и гладких мышц позвоночных животных. Исследования свойств титина (тайтина) поперечно-полосатых мышц были начаты в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН З.А. Подлубной, И.М. Вихлянцевым и их коллегами. В диссертационной работе Э.И. Якуповой исследованы агрегационные свойства гладкомышечного титина, имеющего несколько другую структуру и функции.

В работе впервые были получены несколько новых экспериментальных результатов. Методами электронной и атомно-силовой микроскопии и динамического рассеяния света впервые было показано, что гладкомышечный титин формирует *in vitro* два типа аморфных агрегатов: в растворах с ионной силой 0.2М «КСl-агрегаты» и с ионной силой 0.15 М «глицин-агрегаты», которые отличались по способности дезагрегировать при повышении ионной силы до 0.6 М. Методом дифракции рентгеновских лучей у обоих типов агрегатов выявлены рефлексы, характерные для кросс-бета структуры амилоидов. Амилоидная природа «глицин-агрегатов» титина была также подтверждена их связыванием с амилоидо-специфичным красителем тиофлавином Т. Методами кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием показано, что при агрегации титина не происходит изменений во вторичной структуре его молекул. Методом атомно-силовой микроскопии впервые



исследована морфология молекул гладкомышечного титина в растворе с высокой ионной силой. Полученные данные свидетельствуют о высокой агрегационной способности гладкомышечного титина. Достоверность полученных в работе результатов не вызывает сомнения. Выводы логично следуют из результатов исследования и достаточно обоснованы.

Экспериментальные методы данного исследования могут быть использованы для изучения процессов агрегации-деагрегации других амилоидов и амилоидо-подобных белков. Выявлены недостатки методов подтверждения амилоидной природы белковых агрегатов, основанных на связывании агрегатов с красителями.

Диссертационная работа написана весьма лаконично, изложена на 89 страницах, содержит 23 рисунка и 4 таблицы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы из 227 источников.

Обзору литературы посвящена существенная часть работы. Обзор достаточно подробный, в нём уделено внимание истории открытия и исследования амилоидов, с подробными таблицами, показывающими обнаруженную локализацию амилоидных отложений в мышечной ткани в различных органах, условия формирования некоторых амилоидов *in vitro*. Также изложены методы исследования амилоидов *in vivo* и *in vitro*. Описаны структура и функции титина и его агрегационные свойства. Обзор содержит ссылки на классические работы и на последние исследования в рассматриваемой области.

В работе было задействовано большое количество экспериментальных методик, все они описаны в разделе «Материалы и Методы». Автор задействует для исследования агрегационных свойств титина и его внутренней структуры ДСН гель-электрофорез, Вестерн-блот анализ, динамическое светорассеяние, электронную и атомно-силовую микроскопию, круговой дихроизм, инфракрасную спектроскопию с Фурье преобразованием, рентгеновскую дифракцию, анализирует структуры с помощью красителей тиофлавин Т и Конго Красный.

Экспериментальные результаты собраны в одну главу, с группировкой по методам исследования. Видна большая экспериментальная работа, проделанная диссертантом и представляющая несомненный научный интерес. Впервые показано, что титин гладких мышц формирует *in vitro* два типа аморфных агрегатов: «КСI-агрегаты» (в растворе 0.2 М КСI, 10 мМ имидазола, рН 7.0-7.4,) и «глицин-агрегаты» (в растворе 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0-7.4), которые отличались по способности



дезагрегировать/не дезагрегировать при помещении их в условия с более высокой ионной силой (в раствор, содержащий 0.6 М КСl). Показано существование в агрегатах титина характерной кросс-бета структуры амилоидов, без существенных изменений во вторичной структуре его молекул. Амилоидная природа «глицин-агрегатов» титина была также подтверждена их связыванием с амилоидо-специфичным красителем тиофлавином Т. Методом атомно-силовой микроскопии в растворе с высокой ионной силой (0.6 М) исследованы молекулы гладкомышечного титина. Обнаружено, что молекула гладкомышечного титина имеет нитевидную форму толщиной 3-4 нм, длиной ~300 нм с глобулярной головкой на одном конце. При этом были визуализированы два типа олигомеров титина: взаимодействующие друг с другом головками и имеющими уплотнение в центре с отходящими от него молекулами титина, и имеющие вид филаментов длиной 2 мкм и более, на протяжении которых наблюдались периодически расположенные глобулярные утолщения. Полученные данные свидетельствуют о высокой агрегационной способности гладкомышечного титина.

Раздел «Обсуждение» содержит анализ экспериментальных данных и сравнение с имеющимися литературными источниками. Выводы логично следуют из выполненного исследования, достоверны и обоснованы.

Несмотря на очевидные научные достоинства, представленная работа не свободна от некоторых недостатков.

1. Раздел «Материалы и методы» написан чрезмерно кратко. Несмотря на то, что в большинстве подразделов присутствуют ссылки на опубликованные работы, где содержатся подробности методик, ключевые моменты должны быть понятны читателю без обращения к дополнительным источникам.

2. В п. 2.7 «Динамическое светорассеяние» не указаны погрешности измерений. Напротив, в п. 2.11 «Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием» оценка погрешности есть: «оптический путь кюветы составлял  $(4.52 \pm 0.04)$  мкм», но не указаны действия или формулы, приводящие к этим цифрам.

3. В п. 3.7. «Исследование вторичной структуры титина методом инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием» данные таблицы 4 не следуют напрямую из рисунка 17. Следовало бы дать пояснения, на каком основании были сделаны вычисления.

4. Методами кругового дихроизма (КД) и ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием были сделаны оценки процентного содержания альфа-спиралей и



бета-складок во вторичной структуре до и после агрегации титина, и поскольку в процессе агрегации изменения обеих величин были незначительны, был сделан вывод о том, что образование агрегатов не меняет вторичную структуру молекулы. Однако два метода давали несколько разные средние значения процентного содержания  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -складчатых структур, которые достоверно отличаются с учётом приведённых в п. 3.7 стандартных отклонений. Хотелось бы увидеть в работе обсуждение причин таких различий.

5. При помощи дифракции рентгеновских лучей были выявлены целые семейства рефлексов для «КСI-агрегатов» и для «глицин-агрегатов». При этом в работе уделено внимание только двум из них 4.7-4.8Å и 6-11Å, указывающих на характерную кросс-бета структуру амилоидов. Жаль, что остальные рефлексы, указывающие на существование других периодических структур, не получили обсуждения своей природы, хотя бы гипотетического. Интересно было бы увидеть радиальный профиль кольцевого рефлекса 6-11Å, а не только диапазон и среднее значение. В названии CCD детектора допущена досадная опечатка, его имя Platinum135.

К сожалению, в тексте работы содержится изрядное количество опечаток и лабораторных жаргонизмов. Не все аббревиатуры, использованные в тексте диссертации, вошли в Список Сокращений, как то: ЭГТА, ЭДТА, ДТТ, ДСН, ПААГ, PVDF и др.

Высказанные замечания не влияют на общую положительную оценку. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, имеет самостоятельную научную ценность. Все полученные результаты являются новыми. По теме диссертации опубликовано 5 статей в изданиях, входящих в Перечень ВАК, причём в трёх из них соискатель является первым автором. Основные результаты неоднократно доложены на отечественных и международных конференциях.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Диссертация Якуповой Эльмиры Ильдаровны «Исследование структурных изменений в гладкомышечном титине при формировании агрегатов *in vitro*», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика является научно-квалификационной работой, в которой автором обнаружена способность титина гладких мышц формировать аморфные амилоидо-подобные агрегаты *in vitro*, способные к частичной дезагрегации при повышении ионной силы. Выдвинутые на основе проведённых экспериментов положения можно считать новым научным достижением, значимым для области

знаний, квалифицируемой как специальность 03.01.02 – биофизика, и вносящее вклад в понимание механизма агрегации-деагрегации белков. По совокупности изложенных экспериментальных и теоретических данных, актуальности и научной новизне диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" ВАК Министерства образования и науки РФ, утверждённого постановлением Правительства от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук и паспорту специальности 03.01.02 – биофизика, а соискатель заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биомеханики Института механики МГУ имени М.В.Ломоносова, доктор физико-математических наук

Кубасова Наталия Алексеевна

4.12.2020.





## Сведения об оппоненте

**Кубасова Наталия Алексеевна**, доктор физико-математических наук (03.01.02 – биофизика).

*Организация:* Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Институт механики.

*Должность:* ведущий научный сотрудник (в.н.с.)

*Почтовый адрес:* 119192 Москва, Мичуринский проспект, 1.

*Сайт Института:* <http://www.imec.msu.ru/>

*e-mail:* [natalia@imec.msu.ru](mailto:natalia@imec.msu.ru)

*Телефон:* +7(495)939-12-52

### Список публикаций **Кубасовой Н.А.** по тематике диссертации Якуповой Э.И.

1. Marchenko M. A., Nefedova V.V., Yampolskaya D.S., Kopylova G.V., Shchepkin D.V., Bershitsky S.Y., **Koubassova N.A.**, Tsaturyan A.K., Levitsky D.I., Matyushenko A.M. Amino Acid Residues of Tropomyosin on Its Flexibility and Function // International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21. No. 22. P. 8720-8720.
2. Nefedova V.V., **Koubassova N.A.**, Borzova V.A., Kleymenov S.Y., Tsaturyan A.K., Matyushenko A.M., Levitsky D.I. Tropomyosin pseudo-phosphorylation can rescue the effects of cardiomyopathy-associated mutations. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 28. S0141-8130(20)34855-8. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.201. Online ahead of print.
3. Щепкин Д.В., Набиев С.Р., **Кубасова Н.А.**, Бершицкий С.Ю., Копылова Г.В. Сравнение функциональных характеристик миозина быстрой и медленной скелетных мышц. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 169, № 3. С. 310-313.
4. Padrón R, Ma W, Duno-Miranda S, **Koubassova N**, Lee KH, Pinto A, Alamo L, Bolaños P, Tsaturyan A, Irving T, Craig R. The myosin interacting-heads motif present in live tarantula muscle explains tetanic and posttetanic phosphorylation mechanisms. // Proc Natl Acad Sci USA. 2020. V. 117, No. 22. P. 11865-11874. doi: 10.1073/pnas.1921312117.
5. Kopylova G.V., Matyushenko A.M., **Koubassova N.A.**, Shchepkin D.V., Bershitsky S.Y., Levitsky D.I., Tsaturyan A.K. Functional outcomes of structural peculiarities of striated muscle tropomyosin. // J Muscle Res Cell Motil. 2020. V. 41, No. 1. P. 55-70. doi: 10.1007/s10974-019-09552-8.
6. Kopylova GV, Shchepkin DV, Nabiev SR, Matyushenko AM, **Koubassova NA**, Levitsky DI, Bershitsky SY. Cardiomyopathy-associated mutations in tropomyosin differently affect actin-myosin interaction at single-molecule and ensemble levels. // J Muscle Res Cell Motil. 2019. V. 40, No. 3-4. P. 299-308. doi: 10.1007/s10974-019-09560-8.
7. **Koubassova NA**, Bershitsky SY, Tsaturyan AK. Effects of an Interchain Disulfide Bond on Tropomyosin Structure: A Molecular Dynamics Study. // Int J Mol Sci. 2018. V. 19, No. 11. P. 3376. doi: 10.3390/ijms19113376.
8. Matyushenko AM, **Koubassova NA**, Shchepkin DV, Kopylova GV, Nabiev SR, Nikitina LV, Bershitsky SY, Levitsky DI, Tsaturyan AK. The effects of cardiomyopathy-associated mutations in the head-to-tail overlap junction of  $\alpha$ -tropomyosin on its properties and

interaction with actin. // *Int J BiolMacromol*. 2019. V. 125. P. 1266-1274. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.105.

9. Matyushenko AM, Shchepkin DV, Kopylova GV, Bershitsky SY, **Koubassova NA**, Tsaturyan AK, Levitsky DI. Functional role of the core gap in the middle part of tropomyosin. // *FEBS J*. 2018. V. 285, No. 5. P. 871-886. doi: 10.1111/febs.14369.
10. Alamo L, **Koubassova N**, Pinto A, Gillilan R, Tsaturyan A, Padrón R. Lessons from a tarantula: new insights into muscle thick filament and myosin interacting-heads motif structure and function. // *Biophys Rev*. 2017. V. 9, No. 5. P. 461-480. doi: 10.1007/s12551-017-0295-1.
11. Bershitsky SY, **Koubassova NA**, Ferenczi MA, Kopylova GV, Narayanan T, Tsaturyan AK. The Closed State of the Thin Filament Is Not Occupied in Fully Activated Skeletal Muscle. // *Biophys J*. 2017. V. 112, No. 7. P. 1455-1461. doi: 10.1016/j.bpj.2017.02.017.
12. **Koubassova NA**, Bershitsky SY, Ferenczi MA, Narayanan T, Tsaturyan AK. Tropomyosin movement is described by a quantitative high-resolution model of X-ray diffraction of contracting muscle. // *Eur Biophys J*. 2017. V. 46, No. 4. P. 335-342. doi: 10.1007/s00249-016-1174-6.