

**УТВЕРЖДАЮ**

Директор федерального государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской  
академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)  
д.б.н. Федоров Алексей Николаевич



«29» сентября 2020 г.

## **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

**на диссертационную работу**

**НАГИБИНОЙ Галины Сергеевны**

**«Метод стабилизации структуры белков, основанный на определении и  
закреплении их «ослабленных» участков»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.02 – биофизика.

### **Актуальность избранной темы.**

Диссертационная работа Нагибиной Г.С. посвящена разработке метода стабилизации структуры глобулярных белков. В современном мире белки, в том числе рекомбинантные, являются как важным продуктом биотехнологических и фармацевтических производств, так и удобным инструментом в исследовательской деятельности. Обратной стороной создания улучшенных форм белков часто является снижение стабильности их структуры, вызванное необходимостью введения мутаций. Поиск разумного баланса между желаемым изменением функции и сохранением нативной упаковки белковой глобулы может быть весьма время- и ресурсозатратным. Решением этой проблемы является использование дополнительных методов,

позволяющих стабилизировать структуру рекомбинантного белка. Среди прочих методов себя хорошо зарекомендовало введение в белок искусственных дисульфидных связей. Однако и для этого есть лимитирующий фактор: определение оптимального участка для введения цистеинового мостика, являющееся отправной точкой этого подхода, практически полностью определяет успешность стабилизации структуры белка. Молекулярное моделирование, чаще всего используемое для этой задачи в настоящее время, требует больших вычислительных мощностей и при этом не всегда гарантирует надежный результат. Намного более удобный и доступный метод предлагается Нагибиной Г.С. в ее диссертационной работе. Особенностью разработанного автором подхода является уменьшение количества вариантов позиций для введения дисульфидных мостиков – предлагается рассматривать лишь участки, называемые автором «ослабленными», т.е. потенциально наиболее уязвимые к дестабилизации. Для определения «ослабленных» участков используются свободно доступные программы, предсказывающие нативно-развернутость, например, PONDR-FIT и IsUnstruct. Важно отметить, что эти программы просты в использовании и выполняют необходимые вычисления за минуты, что дает предложенному методу преимущество перед упомянутой выше молекулярной динамикой. Предлагаемый диссертантом метод дает исследователям и индустрии новый и удобный инструмент для решения важной проблемы дестабилизации структуры рекомбинантных белков.

### **Научная новизна и оценка достоверности результатов и выводов исследования.**

Диссертация Нагибиной Галины Сергеевны отличается ясностью и последовательностью, в полной мере раскрывающей ход исследовательской работы и значимость полученных ею практических результатов и фундаментальных выводов. Сформулированные выводы соответствуют поставленным задачам. Методологический уровень работы находится на

высоком уровне как за счет использования современных физических, биохимических и вычислительных методов, так и за счет обоснованных и ясных постановок экспериментов и контролей. Все полученные автором экспериментальные результаты являются новыми и прошли апробацию на международных и российских конференциях. По теме диссертации автором опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК. Личный вклад Нагибиной Г.С. подтверждается тем, что во всех публикациях она является первым автором.

Основным результатом диссертационной работы является разработка нового подхода для увеличения стабильности структуры белка, отличающегося простотой и доступностью. В основе метода лежит введение искусственного дисульфидного мостика в «ослабленный» участок стабилизируемого белка. «Ослабленным» участком считается участок полипептидной цепи белка, предсказываемый программами типа PONDR-FIT и IsUnstruct как нативно-развернутый. Использование разработанного подхода для белка Gao привело к повышению его температуры плавления на 4 градуса. Автором было показано, что стабилизирующим эффектом обладает именно введение дисульфидной связи в предсказанные участки: исследование двух белков (HmaL1 и AaeL1) показало значимые различия в стабильности у форм с дисульфидной связью, введенной в «ослабленные» и структурированные участки.

#### **Оценка содержания выполненной работы в соответствии с требованиями ВАК.**

Диссертационная работа Нагибиной Г.С. имеет структуру, соответствующую установленным правилам ВАК, и состоит из введения, обзора литературных данных, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы.

Глава «Обзор литературных данных» отражает современное состояние исследований по теме диссертации. В ней также формулируются и обсуждаются основные недостатки и ограничения существующих методов стабилизации белков, преодоление которых является одной из целей диссертации. Глава содержит три параграфа. В параграфе «Дисульфидные связи в белках» автор обзора представляет современное представление об искусственных дисульфидных связях, особенностях их дизайна (включая описание и анализ вычислительных методов) и приложений. В параграфе «Программы, предсказывающие нативно-развернутые участки в белках» проводится подробный анализ существующих теоретических подходов для предсказания нативно-развернутых белков. Приводится современная классификация этих методов, которых рассмотрено более 40. Для наиболее известных и популярных приведено подробное описание. Анализ также включает сравнение эффективности описанных методов. Параграф «Характеристика белков, исследованных в работе» посвящен описанию функциональных и структурных особенностей объектов исследования: белков Gao из *Drosophila melanogaster*, L1 из *Aquifex aeolicus* и L1 из *Haloarcula marismortui*.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно и ясно изложено описание всех экспериментальных процедур и параметров программ, использованных в теоретической части исследования. Изложение позволяет использовать раздел для воспроизведения результатов диссертационной работы. Среди многочисленных используемых физико-химических методов исследования белков можно выделить спектроскопию кругового дихроизма, электрофоретическое исследование подвижности белков, флуоресцентную спектроскопию, дифференциальную сканирующую микрокалориметрию, эксклюзионную хроматографию. В параграфах, касающихся теоретической части исследования, отдельно описаны методы анализа аминокислотных последовательностей, визуализации структуры белков и программы по предсказанию нативно-развернутости.

Третья, заключительная, глава представляет результаты экспериментальной проверки предложенного в диссертации подхода. Логически работа разбита на две части: апробация подхода на белке Gao (параграф «Стабилизация  $\alpha$ -субъединицы Go-белка *Drosophila melanogaster*») и проверка фундаментальных предположений, лежащих в его основе, на примере двух других белков (параграф «Исследование белков L1 из *Haloarcula marismortui* и L1 из *Aquifex aeolicus*»). В общем для каждого белка описана и обсуждена следующая экспериментальная рамка. Первым этапом является использование программ, предсказывающих нативно-развернутые участки (PONDR-FIT и IsUnstruct) для поиска «ослабленных» участков белка. Целью следующего этапа является «закрепление» этих участков за счет введения дисульфидных мостиков. Для этого в структуре белка выбирается пара сближенных (около 4-5 Å) и взаимонаправленных аминокислотных остатков, замена которых на остатки цистеина приведет к завязыванию дисульфидной связи.

В параграфе «Стабилизация  $\alpha$ -субъединицы Go-белка *Drosophila melanogaster*» автор описывает пилотный эксперимент, в котором сразу решает нетривиальную задачу: исследовать влияние введения дисульфидной связи в белок Gao, для которого неизвестна пространственная структура. В этой части работы разработанный метод используется так, как предполагается использовать его в широкой практике и позволяет оценить его применимость и удобство. Анализ аминокислотной последовательности белка Gao позволил обнаружить «ослабленный» участок во втором домене белка. Поскольку пространственная структура белка Gao неизвестна, для проектирования дисульфидной связи в исследуемом белке использовалась известная пространственная структура гомологичного белка Gao из другого организма. Перед исследованием изменения стабильности белка был использован метод спектроскопии КД для того, чтобы убедиться, что введенная аминокислотная замена не нарушила структуру белка. Для оценки изменения стабильности автор исследовала процессы тепловой денатурации

белка Gao дикого типа (контроль) и мутантной формы с дисульфидной связью. Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии показано, что введенная в «ослабленный» участок дисульфидная связь привела к повышению температуры денатурации белка Gao на 4 градуса.

Положительный результат, описанный в предыдущем параграфе, вполне закономерно вызывает вопрос о том, что именно приводит к повышению температуры денатурации белка – введение цистеинового мостика именно в «ослабленный» участок или закрепление определенных элементов вторичной структуры белка. На этот вопрос призваны ответить эксперименты, описанные в параграфе, посвященном исследованию белков L1 из *Haloarcula marismortui* и L1 из *Aquifex aeolicus*. Автор предлагает достаточно изящную постановку эксперимента, при которой влияние локальной пространственной структуры на стабилизацию структуры белка исключается. Основная идея эксперимента заключается в том, чтобы выбрать такую пару белков, структура которых будет похожа, а аминокислотная последовательность – различна. «Ослабленность» участка связана с аминокислотной последовательностью и будет различаться в структурно похожих участках при правильном подборе такой пары. Автор проверяет гипотезу о том, что введение цистеинового мостика в структурно похожие участки с разной степенью «ослабленности» приведет к разнице в результатах исследования изменения стабильности и структуры такой пары белков. В паре белков L1 из *Haloarcula marismortui* и L1 из *Aquifex aeolicus*, удовлетворяющей описанному выше условию, найден участок в аминокислотной последовательности с различающимся предсказанием нативно-развернутости. В белке HmaL1 этот участок предсказан как нативно-развернутый, а в белке AaeL1 – как структурированный. С помощью наложения пространственных структур этих белков подтверждено, что найденные участки образуют одинаковые структурные элементы. После введения максимально похожих по положению дисульфидных связей, исследуется их влияние на стабильность структур двух белков. Результатом

эксперимента по плавлению раствора белка HmaL1 являются повышение температуры на 10 градусов в случае введения дисульфидной связи в «ослабленный» участок (показано методом спектроскопии КД). При этом использование методов КД и ДСК позволило убедиться, что дисульфидная связь, закрепляющая структурированный участок белка AaeL1, не повлияла на его температуру плавления. Многообещающим результатом является и то, что стабилизированная форма белка HmaL1 сохранила часть своей функциональной активности, что было показано методом эксклюзионной хроматографии.

Глава завершается Заключением, в котором автор кратко резюмирует основные выводы диссертации и предлагает возможные применения полученных результатов в фундаментальных исследованиях.

**Значимость результатов для соответствующей области науки и рекомендации по использованию результатов и выводов.**

Диссертационная работа Нагибиной Г.С. содержит результаты, представляющие как фундаментальную, так и прикладную значимость. Исследование влияния стабилизирующих дисульфидных мостиков на участки белков с разным уровнем «ослабленности» при схожей структуре само по себе имеет важный фундаментальный смысл. Зависимость изменения стабильности не от структуры белка, а именно от «ослабленности» его аминокислотной последовательности дополняет современные знания о взаимоотношении последовательности и структуры белка и может служить почвой для дальнейших исследований в этой области.

Практическая значимость работы не вызывает сомнений. Разработанный и воспроизводимо описанный метод может быть использован для расширения возможностей белковой инженерии и управляемого дизайна белков с заданным уровнем стабильности. Поскольку показано, что при использовании метода возможно сохранение активности стабилизированного

белка, разработанный подход может оказаться важным и перспективным для индустрии и биотехнологии. Подобное заключение позволяют сделать и другие позитивные особенности метода: доступность и простота использования программ-предикторов, скорость анализа, превосходящая другие подходы и удобство интерпретации результатов предсказания. Диссертационная работа Нагибиной Г.С. предлагает как метод, являющийся хорошей альтернативой существующим для исследовательских лабораторий, так и перспективный задел для доработки и вывода на производственный масштаб.

**При анализе работы возникли следующие вопросы и замечания:**

1. Для чего необходимо повышать стабильность структуры белка? Введение замен аминокислотных остатков может отрицательно повлиять на биологическую функцию белка, учитывает ли это предложенный подход?

2. Для стабилизации структуры в работе использованы искусственные дисульфидные связи. Пробовал ли автор использовать для той же цели солевые мостики, точечные аминокислотные замены?

3. Получен ли кристалл стабилизированной формы белка Gao?

В то же время эти недостатки не являются существенными и не влияют на общую оценку диссертационной работы Нагибиной Галины Сергеевны.

**Заключение.**

Диссертационная работа «Метод стабилизации структуры белков, основанный на определении и закреплении их «ослабленных» участков» по своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне и научно-практической значимости несомненно удовлетворяет требованиям (п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842), предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени



кандидата биологических наук, а ее автор – Нагибина Галина Сергеевна – заслуживает присвоения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02. – биофизика.

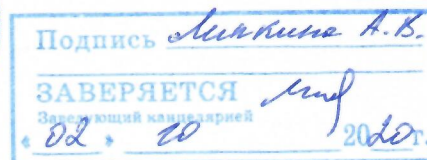
Диссертация и отзыв обсуждены и утверждены на семинаре лаборатории молекулярной биотехнологии федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Института биохимии им. А.Н. Баха 29 сентября 2020 г. (протокол №3).

Старший научный сотрудник  
Лаборатории молекулярной биотехнологии  
Института биохимии им. А.Н. Баха  
ФИЦ Биотехнологии РАН,

к.х.н.

29 сентября 2020 г.

А.В. Липкин



### **Сведения о ведущей организации:**

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Институт биохимии им. А.Н. Баха

Адрес: 119071 г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

Телефон: +7 (495) 954-52-83

Факс: +7 (495) 954-27-32

Эл. Почта: info@fbras.ru

Сайт института: <http://fbras.ru>

### **Список публикаций сотрудников ФИЦ биотехнологии РАН по теме диссертации Нагибиной Г.С.**

1. Filkin, S Yu, Lipkin, A V, Fedorov, A N Phospholipase Superfamily: Structure, Functions, and Biotechnological Applications. *Biochemistry (Mosc)* 2020 Jan; 85(Suppl 1):S177-S195. doi: 10.1134/S0006297920140096.
2. Yurkova M.S., Sharapova O.A., Zenin V.A., and Fedorov A.N. Versatile format of minichaperone-based protein fusion system. *Sci Rep.* 2019 Oct, 21(9) 15063. doi: 10.1038/s41598-019-51015-0
3. Filkin, S Y, Chertova, N V, Zenin, A A, Lipkin, A V, Sichev, A A, Bityak, D S, Sadykhov, E G, Popov, V O, Fedorov, A N Expression, purification and biophysical characterization of recombinant *Streptomyces violaceoruber* phospholipase PLA2 overproduced in *Pichia pastoris*. *Prep Biochem Biotechnol*, 2020;50(6):549-555. doi: 10.1080/10826068.2020.1712657.
4. Nikitin NA, Zenin VA, Trifonova EA, Ryabchevskaya EM, Yurkova MS, Kondakova OA, Fedorov AN, Atabekov JG, Karpova OV Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment. *Data Brief.* 2018 Oct, 26 (21) 1504-1507. doi: 10.1016/j.dib.2018.10.102.
5. Trifonova EA, Zenin VA, Nikitin NA, Yurkova MS, Ryabchevskaya EM, Putlyaev EV, Donchenko EK, Kondakova OA, Fedorov AN, Atabekov JG, Karpova OV Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus. *Antiviral Res.* 2017 May, 144 (13) 27-33. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.05.006

6. Sharapova OA, Yurkova MS, Fedorov AN A minichaperone-based fusion system for producing insoluble proteins in soluble stable forms. *Protein Eng Des Sel*. 2016 Nov, 29(2) 57-64. doi: 10.1093/protein/gzv060.
7. Sokol MB, Nikolskaya ED, Yabbarov NG, Zenin VA, Faustova MR, Belov AV, Zhunina OA, Mollaev MD, Zabolotsky AI, Tereshchenko OG, Severin ES Development of novel PLGA nanoparticles with co-encapsulation of docetaxel and abiraterone acetate for a highly efficient delivery into tumor cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 May, 107(4) 1150-1158. doi: 10.1002/jbm.b.34208.
8. Nikitin NA, Zenin VA, Trifonova EA, Ryabchevskaya EM, Kondakova OA, Fedorov AN, Atabekov JG, Karpova OV Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018 Aug, 97(1) 127-133. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.06.010.
9. M. S. Yurkova, O. I. Savvin, V. A. Zenin, A. N. Fedorov Design and Characterization of a Methionineless Variant of Thermostable Chaperon GroEL from *Thermus thermophilus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019 May, 55 (1), 112–116. doi: 10.1134/S0003683819020157.
10. Zenin, V.A., Novikova, L.A., Yurkova, M.S. *et al.* Chemical Modification of Fusion Protein Based on the *Thermus thermophilus* GroEL Chaperon with AEBSF Protease Inhibitor. *Appl Biochem Microbiol* 55, 649–653 (2019). doi: 10.1134/S0003683819060164.
11. Yurkova M.S., Zenin V.A., Sadykhov E.G., and Fedorov A.N. Dimerization of the Antimicrobial Peptide Polyphemusin I into One Polypeptide Chain: Theoretical and Practical Consequences. *Biotechnology*. 2019, 35(5) 36-41. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-36-41.