

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Нагибиной Галины Сергеевны «Метод стабилизации структуры белков, основанный на определении и закреплении их «ослабленных» участков» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02. –  
Биофизика.

### **Об актуальности предмета исследования**

Работа посвящена поиску простых и надежных способов узнавания сайтов полипептидной цепи белков для их модификации с целью повышения структурной стабильности. Результаты такого исследования являются важными не только для решения некоторых фундаментальных вопросов, но и необходимостью в современной биотехнологии. Создание методики стабилизации структуры глобулярных белков может быть применимо в промышленной и медицинской биотехнологии, а также и в исследованиях молекулярной биологии, как первый (универсальный) этап работы с индивидуальными белками.

Основным способом стабилизации структуры белков с помощью точечных аминокислотных замен является введение искусственных дисульфидных связей. Закрепление дисульфидной связью структуры белка приводит к уменьшению ее флуктуаций и подвижности, что приводит к повышению устойчивости структуры белка к денатурантам и температуре. Однако до сих пор остается открытым вопрос, какой именно участок структуры требует введения дисульфидной связи для стабилизации структуры белка в целом. Большинство современных разработанных методик для стабилизации структуры белков включает в себя дорогостоящие и/или затратные по времени этапы. Особенные затруднения возникают при выборе места для аминокислотных замен. Как правило, далеко не все из спроектированных с помощью различных подходов введения дисульфидных мостиков приводят к повышению стабильности структуры, зачастую они наоборот, дестабилизируют структуру белка. В связи с этим возникает необходимость в наличии надежного и доступного для экспериментатора подхода, позволяющего стабилизировать структуру белка. По этой причине выбранная диссертантом тема является крайне актуальной и важной для развития молекулярной биологии и биотехнологии.

## **О структуре диссертации**

Диссертационная работа Нагибиной Г.С. написана по традиционной схеме и состоит из: Введения, Обзора литературы, Материалов и методов исследования, Resultados и обсуждения, Выводов и Списка литературы. Работа представлена на 118 страницах, содержит 18 рисунков и 2 таблицы. Список литературы, использованной в работе, включает 130 ссылок. Основные результаты работы представлены в виде 7 тезисов конференций и 4 статей, опубликованных в ведущих отечественных и зарубежных журналах из перечня ВАК.

## **О представлении материала**

Работа написана хорошим литературным языком. Читатель не наталкивается ни на жаргонизмы, ни на грамматические ошибки. Стиль изложения в основном ясный и логичный. Тем более досадно встретить: «...в структуре этого белка он структурирован...» (стр.100, 11 строка сверху). Текст иллюстрирован информативными рисунками и графиками. Все это облегчает восприятие и понимание представленных результатов.

## **О существе работы и характере ее выполнения**

Диссертационная работа Нагибиной Г.С. посвящена разработке и проверке подхода к созданию стабильных форм глобулярных белков. Подход, предложенный в работе, заключается в поиске «ослабленных» участков структуры белка и их дальнейшем закреплении искусственными дисульфидными связями. Суть подхода можно представить как три последовательных этапа: (1) поиск «ослабленных» участков в аминокислотных последовательностях белков (осуществляется в программах PONDR-FIT и IsUnstruct); (2) дизайн дисульфидных связей в найденных участках; (3) оценка влияния введенных дисульфидных связей на стабильность структуры белков с помощью широкого спектра физико-химических методов. Именно в таком порядке проведена работа с каждым из трех белков, выбранных в качестве объектов.

Первое испытание методики автор осуществил на белке Gao из *Drosophila melanogaster*. Несмотря на сложности, возникшие в процессе проектирования аминокислотных замен ввиду отсутствия известной пространственной структуры, авторам удалось закрепить дисульфидной связью предсказанный «ослабленным» участок белка. Методом спектроскопии КД показано, что введенная замена не нарушила нативную упаковку белка. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии

исследован процесс тепловой денатурации белков Gao дикого типа и мутантной формы. Показано, что введенная дисульфидная связь увеличила температуру плавления домена, в который она была введена, на 4 градуса. Однако успешный результат экспериментов с Gao оставил открытым вопрос о том, что именно повлияло на стабилизацию структуры. Диссертант предположил, что в данном случае влиять на стабильность структуры может как «ослабленность» аминокислотной последовательности закрепленного дисульфидной связью участка, так и его пространственная упаковка. Для проверки озвученного предположения автором был предложен оригинальный подход: исследовать пару гомологичных белков с разным предсказанием нативно-развернутости в похожем по структуре участке. Таким образом, автором предполагалось исключить влияние пространственной структуры, и исследовать влияние на стабильность белка дисульфидной связи, закрепляющей именно его «ослабленный» участок.

Для проверки были выбраны рибосомные белки L1 из *Haloarcula marismortui* и L1 из *Aquifex aeolicus*. Диссертантом подробно описывается соответствие пары белков выставленным критериям: с помощью теоретических расчетов установлена идентичность аминокислотных последовательностей двух белков (33%), показано наложение пространственных структур двух белков. Отмечу, что в тексте диссертации отсутствует любое другое доказательство сходства структур, кроме визуального. В аминокислотных последовательностях белков найден подходящий для проверки участок, структурно схожий и отличающийся по предсказаниям. В нем практически в одном положении спроектированы дисульфидные связи. В результате такой проверки автор ожидает, что дисульфидная связь, введенная в «ослабленный» участок приведет к повышению стабильности структуры белка. Дисульфидная связь, введенная в предсказанный структурированным участок, влияния на стабильность структуры иметь не должна.

Подробно изложен процесс подбора условий для исследования структуры и стабильности белков AaeL1 и HmaL1 дикого типа и их мутантных форм с искусственными дисульфидными связями. Следует отметить, что белки L1 из двух организмов оказались довольно сложными объектами для исследований, требующими особо кропотливого подбора условий для проведения экспериментов. Так, HmaL1 является галофильным белком, требующим условий с высокой концентрацией солей, а из-за отсутствия в аминокислотной последовательности собственных остатков триптофана и высокой склонности к агрегации его структура не может быть

исследована многими из физико-химических методов. AaeL1 – экстремофильный белок, температура денатурации которого превышает 100°C. Для исследования процесса плавления раствора белка автору пришлось прибегнуть к его дополнительной денатурации. Тем не менее, диссертант успешно справился со всеми сложностями, возникшими в процессе исследования этих белков.

В работе показано, что действительно, стабилизирующим эффектом обладает только дисульфидная связь, закрепляющая предсказанный «ослабленным» участок, в то время как спроектированная в структурированном участке дисульфидная связь на стабильность структуры белка не влияет. Данные результаты получены при исследовании тепловой денатурации белков AaeL1 и HmaL1 методами спектроскопии КД и дифференциальной сканирующей калориметрии. Завершающим этапом работы стала проверка сохранности биологической функции стабилизированной формы белка HmaL1. Методом эксклюзионной хроматографии автором показано сохранение функции (образования комплекса с рРНК) стабилизированной формы белка HmaL1, хотя и в ослабленном виде. Такой результат вселяет надежду в возможность широкого применения предложенного диссертантом подхода к созданию функциональных форм белков с увеличенной стабильностью.

К некоторым недостаткам работы необходимо отнести следующие:

- В тексте недостаточно четко сформулирован сам предложенный подход. Суть его можно уловить лишь из постановки задач исследования.
- Стоило бы уделить большее внимания процессу проектирования аминокислотных замен. Несмотря на то, что данный этап работы очень важен, автор касается его лишь вскользь.
- На рис. 12 А показана вероятность аминокислотных остатков двух белков L1 быть неупорядоченными, однако по оси абсцисс приведена только одна нумерация, к какому из белков она принадлежит, не понятно.
- На рис. 15 Б и В применены шкалы T°C и T°K для иллюстрации одного и того же процесса.
- Каждая экспериментальная глава заканчивается рисунком с подписью. На мой взгляд, лучше было бы заканчивать мини заключением, которое подводило бы читателя к основным выводам.

- Несмотря на интересные результаты, полученные в работе, хотелось бы сказать, что для проверки предлагаемых методов исследования белков, используют белки разных структурных классов:  $\alpha$ -белки,  $\beta$ -белки,  $\alpha\beta$ -белки и др., чтобы можно было заключить для всех ли типов подходит данный метод. Но это, скорее, будущие интересные и необходимые исследования, как я надеюсь.

Однако эти, даже не замечания, а оплошности и пожелания никак не лишают представленную работу ее высокой ценности. Диссертация Галины Сергеевны, несомненно, соответствует формальным и неформальным высоким требованиям к уровню работ, представляемых на соискание искомой степени.

### **О выводах**

По материалам работы диссертант сформулировал 4 вывода, которые полностью обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Отметим, что сформулированные как «выводы», они скорее описывают основные результаты диссертации. В результате работы автором впервые был предложен метод повышения стабильности структуры глобулярных белков, основанный на поиске и закреплении их «ослабленных» участков, и оригинально проверен на примере трех белков. Успешная стабилизация структур белков, исследованных в работе, а также проверка сохранности биологической функции, делает предложенный метод применимым для повышения стабильности структур глобулярных белков. Такой метод, в силу своих неоспоримых преимуществ: простоты и удобства, безусловно, будет полезен для экспериментаторов, целью которых является стабилизация структуры белков.

### **Заключение оппонента**

Диссертационная работа Нагибиной Г.С. выполнена на высоком научно-методическом уровне и является завершенной научно-исследовательской работой, внесшей несомненный вклад в развитие методов направленного влияния на свойства структуры белков, что отражено в публикациях автора в авторитетных отечественных и зарубежных журналах. На основании выполненных автором исследований, в диссертации предложен инструментальный подход к повышению стабильности структуры глобулярных белков. Полученные результаты достоверны, выводы

обоснованы. Результат работы представляет интерес для специалистов молекулярных биологов и биофизиков, работающих в фундаментальных и прикладных областях науки.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

Работа Нагибиной Г.С. полностью соответствует всем требованиям Положения о присуждении ученых степеней ВАК, а ее автор, Нагибина Галина Сергеевна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Заведующий лабораторией ЯМР-исследований биосистем

Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН,

Доктор физико-математических наук,

Профессор

В. П. Кутышенко

15 сентября 2020 г.



Подпись: *Кутышенко В.П.*  
УДОСТОВЕРЯЮ-ЗАМ. ЗАВ. ОДОУ  
*С. Г. БАКАНОВА*

*15.09.2020*

## Сведения об оппоненте

### **Кутышенко Виктор Павлович**

*Ученая степень, звание:* Доктор физико-математических наук (специальность 03.01.02 – биофизика), профессор

*Место работы:* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экспериментальной и теоретической биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), лаборатория ЯМР-исследований биосистем.

*Должность:* Заведующий лабораторией ЯМР-исследований биосистем, главный научный сотрудник.

*Адрес организации:* 142290, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

*Адрес эл. почты организации:* office@iteb.ru

*Телефон:* (495) 632-78-69

*Факс:* (4967) 33-05-53

*Сайт организации:* <https://iteb.ru>

**Научные публикации ведущего оппонента** по тематике диссертационного исследования Нагибиной Г.С. за последние пять лет (2015-2020 гг.):

1. Solovieva M.E., Shatalina Yu.V., Solovyev V.V., Sazonov A.V., Kutysenko V.P., Akatov V.S. Hydroxycobalamin catalyzes the oxidation of diethyldithiocarbamate and increases its cytotoxicity independently of copper ions // *Redox Biology*. 2019. V. 20. P. 28–37.
2. Буданцев А.Ю., Кутышенко В.П. Окислительно-восстановительные реакции в хромсодержащих фиксаторах биологического материала. // *Биофизика*. 2018. Т. 63, вып. 5. С. 837–843.
3. Kutysenko VP, Prokhorov DA, Mikoulinskaia GV, Molochkov NV, Paskevich SI, Uversky VN. Evidence of the residual tertiary structure in the urea-unfolded form of the bacteriophage T5 endolysin. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2017. V. 35, Iss. 6. P. 1331-1338. doi: 10.1080/07391102.2016.1182948.
4. Kutysenko V. P., Mikoulinskaia G. V., Molochkov N. V., Prokhorov D. A., Taran S. A., Uversky V. N. Structure and dynamics of the retro-form of the bacteriophage T5 endolysin. // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016. V. 1864. P. 1281–1291.
5. Kutysenko V. P., Budantsev A.Yu., and Uversky V. N. Analysis of seasonal changes in plants by high-resolution NMR spectroscopy: Looking at the aqueous extracts from different plant tissues. // *Journal of Nature and Science*. 2015. V. 1, No.5, e88, 201.
6. Kutysenko V.P., Beskaravayny P.M., Uversky V.N. “In-plant” NMR: Analysis of the Intact Plant *Vesicularia dubyana* by High Resolution NMR Spectroscopy. // *Molecules*. 2015. V. 20. P. 4359-4368. doi:10.3390/molecules20034359.
7. Prokhorov D.A., Mikoulinskaia G.V., Molochkov N.V., Uversky V.N., Kutysenko V.P. High-resolution NMR structure of a Zn<sup>2+</sup>-containing form of the bacteriophage T5 L-alanyl-D-glutamate peptidase. // *RSC Adv*. 2015. V. 5. P. 41041- 41049.