



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ И ФИЗИОЛОГИИ
Уральского отделения Российской академии наук
(ИИФ УрО РАН)
Первомайская ул., 106,
г. Екатеринбург, 620049
Тел./факс (343) 374-00-70
e-mail:secretar@iip.uran.ru

УТВЕРЖДАЮ

Директор
ИИФ УрО РАН
профессор РАН

О.С. Соловьёва

23.11.2020 № 16381/01-251

На №97-01-8-6215 ИТЭБ РАН от 20.10.20205 г.



ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертационную работу Якуповой Эльмиры Ильдаровны «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».

Актуальность темы

Подавляющее число биохимических процессов в живых организмах происходит при участии белков. После синтеза большинство белков подвергается фолдингу – упаковке в компактные (нативные) структуры, что необходимо для их нормального функционирования. При этом нарушения в структуре белка могут приводить к агрегации и нарушению его функции. Существует, в частности, вероятность перехода пептидов и белков из нативной конформации в амилоидные агрегаты/фибриллы с кросс-β структурой. Такие белковые агрегаты могут образовываться в различных тканях, что ведёт, как считается, к развитию целого ряда заболеваний, таких как амилоидоз печени, почек, селезенки, болезнь Альцгеймера, Паркинсона, диабет II типа. Причины и механизмы формирования патологических амилоидных агрегатов в организме не ясны, а их исследование затруднено, так как на сегодняшний день нет моделей амилоидной агрегации белков *in vivo*. Поэтому для исследования механизмов формирования амилоидных агрегатов разными белками используются *in vitro* модели. К настоящему времени выявлен целый ряд белков, способных при определенных условиях *in vitro* образовывать амилоидные либо амилоидо-подобные агрегаты или фибриллы, которые не

обнаруживаются *in vivo*. Одним из таких белков является титин – гигантский белок гладких и поперечнополосатых мышц позвоночных животных. Учитывая ряд агрегационных особенностей титина, таких как высокая скорость образования агрегатов и их формирование в условиях, близких к физиологическим значениям ионной силы и pH, а также структурную особенность титина – его молекула состоит из чередующихся Ig-подобных и FnIII-подобных доменов с β -складчатой структурой – этот белок представляется подходящим объектом для изучения механизмов белковой агрегации, в том числе и амилоидного типа. Таким образом, актуальность темы диссертационной работы Э.И. Якуповой, посвященной исследованию структурных изменений в гладкомышечном титине при формировании им различных типов агрегатов *in vitro*, несомненна.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Э.И. Якуповой базируется на большом объеме экспериментальных данных, полученных в условиях *in vitro* при исследовании агрегации гладкомышечного титина. В работе использовано множество методов исследования: препаративная биохимия, ДСН-гель-электрофорез и Вестерн-блот анализ для выделения и идентификации титина из мышцы желудков курицы; регистрация динамического светорассеяния, электронная и атомно-силовая микроскопия для изучения процесса агрегации белка и морфологии агрегатов; круговой дихроизм, инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием для исследования вторичной структуры белка; флуоресцентный и спектральный анализ; поляризационная микроскопия; рентгеновская дифракция для определения амилоидной природы агрегатов титина. В результате исследования показано, что титин гладких мышц, не претерпевая изменений во вторичной структуре, формирует *in vitro* амилоидные агрегаты, которые дезагрегируют при повышении ионной силы раствора. На основании полученных результатов высказано предположение о возможности агрегации/деагрегации титина *in vivo*, что может иметь функциональное значение. Принимая во внимание большой объем полученных результатов и внушительный арсенал используемых методов можно говорить о высокой степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Методами электронной, атомно-силовой микроскопии и методом динамического рассеяния света впервые показано, что титин гладких мышц формирует *in vitro* два типа

аморфных агрегатов: «KCl-агрегаты» и «глицин-агрегаты», которые отличаются способностью дезагрегировать/не дезагрегировать при ионной силе, повышенной до 0.6 М. Методом рентгеновских дифракции в двух типах агрегатов титина выявлены рефлексы, характерные для кросс-β структуры амилоидов. При этом автор справедливо отмечает, что диффузность рентгеновских рефлексов, особенно в «KCl-агрегатах,» указывает на то, что β-листы не являются строго ориентированными, означая, что четвертичная структура агрегированного титина лишь близка к кросс-β и по этой причине эти агрегаты следует считать амилоидо-подобными, а не истинно амилоидными. Амилоидная природа «глицин-агрегатов» титина подтверждена их связыванием с амилоидо-специфичным красителем тиофлавином Т. Методами кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием показано, что при агрегации титина вторичная структура его молекул не меняется.

Автором впервые исследована морфология молекул гладкомышечного титина в растворе с высокой ионной силой с помощью атомно-силовой микроскопии. Показано, 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: 1) взаимодействующие друг с другом головками и уплотнением в центре с отходящими от него молекулами титина; 2) нити длиной 2 и более микрометров, на которых периодически расположены глобулярные утолщения. Полученные данные указывают на высокую агрегационную способность гладкомышечного титина. Всё перечисленное демонстрирует новизну полученных в работе результатов, а их достоверность не вызывает сомнения.

Значимость полученных результатов для науки практики

Фундаментальное значение работы состоит в расширении представлений об особенностях процесса амилоидной агрегации белков, в частности, гладкомышечного титина. Проведённые морфологические исследования открывают перспективы изучения локализации титина в гладкомышечных клетках, а также выяснения роли его возможной агрегации *in vivo*. В работе выявлены недостатки «традиционных» методов подтверждения амилоидной природы белковых агрегатов, основанных на их способности связывать красители. В частности, показана неспецифичность связывания красителя Конго красного с амилоидными агрегатами титина. Результаты работы важны не только для фундаментальной, но и для прикладной науки, поскольку указывают пути поиска новых подходов и методов подтверждения амилоидной природы белковых агрегатов *in vitro*.

О содержании и оформлении диссертации

Диссертация Э.И. Якуповой оформлена в традиционном стиле и включает в себя все необходимые разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы. Рукопись изложена на 89 страницах, содержит 23 рисунка и 4 таблицы. Список литературы состоит из 227 источников отечественной и зарубежной литературы. Работа хорошо проиллюстрирована и читается с интересом.

В обзоре литературы изложены основные современные сведения об образовании амилоидных агрегатов, свойствах амилоидов, истории открытия амилоидов и методах их изучения. Очень удачной представляется таблица, компактно суммирующая методы исследования амилоидов и результаты, получаемые этими методами в *in vivo* и *in vitro* экспериментах. Приведена информация о титине поперечнополосатых и гладких мышц, его структуре, функциях и свойствах, включая агрегационные.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных экспериментальных подходов. Стоит ещё раз обратить внимание на то, что в работе использовано большое количество современных биофизических методов, позволивших решить поставленные в работе задачи.

Раздел «Результаты», состоит из 10 пунктов, хорошо проиллюстрирован. В разделе отражена большая экспериментальная работа, проделанная диссертантом и представляющая несомненный научный интерес. Раздел «Обсуждение» включает анализ экспериментальных и литературных данных. Заключение и выводы обоснованы, достоверны, логично вытекают из результатов проведённого исследования и полноценно отражают содержание диссертации.

Замечания

Не подвергая ревизии интерпретацию и значимость полученных результатов, хочется, тем не менее, высказать пожелание, которое могло бы усилить впечатление от представленной диссертации. Оно заключается в том, что в диссертационной работе не обращено внимание на некоторые различия в данных о вторичной структуре титина, полученных при помощи кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием. Такие отличия ставят вопрос о погрешности методов и их интерпретации.

В тексте автореферата и в оглавлении диссертации имеется забавная ошибка, где куриные желудки, из которых выделяли титин, названы желудочками, то есть отделами миокарда. Ошибка эта, конечно же, является результатом опечатки, и, разумеется, не влияет на ценность работы.

Вывод 7 диссертации является предположением о возможности образования в клетках гладких мышц амилоидо-подобных агрегатов (видимо, титина), которые названы «функциональными» и способными дезагрегировать. Желательно пояснить, в чём состоит такая функциональность, и какие условия могут привести к дезагрегации *in vivo*, если *in vitro* таким условием было серьёзное повышение ионной силы раствора.

Заключение

В целом, диссертационная работа Якуповой Эльмиры Ильдаровны на тему «Исследование структурных изменений в гладкомышечном титине при формировании агрегатов *in vitro*» является завершённой научно-квалификационной работой, которая расширяет фундаментальные представления об особенностях процесса амилоидной агрегации белков на примере агрегации мышечного белка титина. Результаты исследования, указавшие на неспецифичность связывания красителя Конго красного с амилоидами, имеют практическое значение, поскольку должны учитываться в практической медицине при диагностике амилоидозов.

Результаты работы опубликованы в пяти статьях в журналах, входящих в перечень рецензируемых журналов, рекомендованных ВАК РФ, и множестве тезисов российских и международных конференций. По совокупности изложенных экспериментальных и теоретических данных, актуальности и научной новизне, а также личного вклада автора, диссертационная работа полностью соответствует п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, и паспорту специальности 03.01.02 – биофизика, а её автор, Якупова Эльмира Ильдаровна, несомненно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук.

Отзыв составил:

Заведующий лабораторией
биологической подвижности
Института иммунологии и физиологии УрО РАН
620049, Российская Федерация, г. Екатеринбург
ул. Первомайская, д. 106
Тел.: +7 (343) 374 1316
email: s.bershitsky@iip.uran.ru
доктор биологических наук

Бершицкий Сергей Юрьевич

Сведения о ведущей организации

Название организации - Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (ИИФ УрО РАН)

Почтовый адрес – 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106

Телефон /факс - +7 (343) 374 0070

e-mail – secretar@iip.uran.ru

Сайт - www.iip.uran.ru

Специальности, отрасли науки – 03.03.01 – физиология (биологические и медицинские науки); 03.01.02 – биофизика (биологические науки); 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология (биологические и медицинские науки).

Список публикаций сотрудников Института по тематике диссертации Э. И. Якуповой за последние 5 лет (не более 15):

1. Щепкин Д.В., А.М. Матюшенко, С.Ю.Бершицкий, Г.В. Копылова. (2019). Влияние дисульфидной шивки молекулы тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие в миокарде предсердий. Бюлл. экп. биол. мед. 167 (1):72-75.
2. Набиев С.Р., Л.В. Никитина, О.П. Герцен, А.М. Матюшенко, Д.В. Щепкин, Г.В. Копылова, С.Ю. Бершицкий, А.К. Цатурян, Д.И. Левицкий. (2018). Влияние стабилизирующих мутаций в центральной части альфа-цепи тропомиозина на изгибную жёсткость реконструированных тонких нитей, содержащих его альфа- бета-гетеродимеры. Биофизика 63.1:28-33.
3. Кочубей П.В., С.Ю.Бершицкий (2016). Возможная причина нелинейного роста напряжения в активированном мышечном волокне при его растяжении. Бюлл. экп. биол. мед. 162.7:15-19. IF 0.718.
4. Matyushenko A.M., V.V. Nefedova, D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, V.Y. Berg, A.V. Pivovarova, S.Y. Kleymenov, S.Y. Bershitsky, D.I. Levitsky. (2020). Mechanisms of disturbance of the contractile function of slow skeletal muscles induced by myopathic mutations in the tropomyosinTPM3gene. FASEB J., DOI:10.1096/fj.202001318R. Q1
5. Matyushenko A.M., D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, S.Y. Bershitsky, D.I. Levitsky. (2020). Unique functional properties of slow skeletal muscle tropomyosin. Biochimie 174:1-8. DOI:10.1016/j.biochi.2020.03.013. Q1
6. Shchepkin D.V., S.R. Nabiev, L.V. Nikitina, A.M. Kochurova, V.Y. Berg, S.Y. Bershitsky, G.V. Kopylova. (2020). Myosin from the ventricle is more sensitive to omecamtiv mecarbil than myosin from the atrium. BBRC 528.4:658-663. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.05.108. Q1
7. Matyushenko A.M., N.A. Koubassova, D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, S.R. Nabiev, L.V., Nikitina, S.Y. Bershitsky, D.I. Levitsky, A.K. Tsaturyan. (2018). The effects of cardiomyopathy-associated mutations in the head-to-tail overlap junction of α -tropomyosin on its properties and interaction with actin. Int. J. Biol. Macromol. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.105. Q1
8. Bershitsky S.Y., D.S. Logvinova, D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, A.M. Matyushenko. (2018). Myopathic mutations in the β -chain of tropomyosin differently affect the structural and functional properties of $\beta\beta$ - and $\alpha\beta$ -dimers. FASEB J. DOI:10.1096/fj.201800755R. Q1
9. Matyushenko A.M., D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, S.Y. Bershitsky, N.A. Koubassova, A.K. Tsaturyan, D.I. Levitsky. (2018). Functional role of the core gap in the middle part of tropomyosin. FEBS J. DOI:10.1111/febs.14369. Q1

10. Shchepkin D.V., L.V. Nikitina, S.Y. Bershitsky, G.V. Kopylova. (2017). The isoforms of α -actin and myosin affect the Ca^{2+} regulation of the actin-myosin interaction in the heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490.2:324-9. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.06.043. Q1
11. Bershitsky S.Y., N.A. Koubassova, M.A. Ferenczi, G.V. Kopylova, T. Narayanan, A.K., Tsaturyan. (2017). The closed state of the thin filament is not occupied in fully activated skeletal muscle. *Biophys. J.* 112.7:1455–61. DOI:10.1016/j.bpj.2017.02.017. Q1
12. Koubassova N.A., S.Y. Bershitsky, M.A. Ferenczi, T. Narayanan, A.K. Tsaturyan. (2017). Tropomyosin movement is described by a quantitative high-resolution model of X-ray diffraction of contracting muscle. *Eur. Biophys. J.* 46:335–42. DOI:10.1007/s00249-016-1174-6. Q2
13. Matyushenko A.M., D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, K.E. Popruga, N.V. Artemova, A.V., Pivovarova, S.Y. Bershitsky, D.I. Levitsky (2017). Structural and Functional Effects of Cardiomyopathy-Causing Mutations in the Troponin T-Binding Region of Cardiac Tropomyosin. *Biochemistry* 56.1:250-9. DOI:10.1021/acs.biochem.6b00994. Q1
14. Matyushenko A.M., N.V. Artemova, D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, S.R. Nabiev, L.V. Nikitina, D.I. Levitsky, S.Y. Bershitsky (2017). The interchain disulfide cross-linking of tropomyosin alters its regulatory properties and interaction with actin filament. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482:305-9. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.11.059. Q1
15. Kopylova G.V., S.N. Nabiev, L.V. Nikitina, D.V. Shchepkin, S.Y. Bershitsky (2016). The properties of the actin-myosin interaction in the heart muscle depend on the isoforms of myosin but not of α -actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476.4:648-53. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.06.013. Q1

Материалы диссертации рассмотрены на семинаре лаборатории биологической подвижности Института иммунологии и физиологии УрО РАН 27 октября 2020 года, протокол № 2/10/20; текст отзыва принят единогласно.

Отзыв ведущей организации поступил
Учёный секретарь Совета Д 002.093.01

« » _____ 2020 г.
Н.Ф. Ланина