

ВІДЗІВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Трусової Валерії Михайлівни «**Білок-ліпідні взаємодії як модулятор агрегаційної поведінки білків**», поданої на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Робота Трусової В.М. присвячена дослідженню молекулярних механізмів агрегації лізоциму, аполіпопротеїну А-I, А β -пептиду при їх взаємодії з ліпідними структурами, що є моделями реальних мембран клітини. Ця тема набула своєї **актуальності** в останні десятиріччя, у зв'язку з кореляцією наявності амілоїдів та високовпорядкованих фібрилярних структур з різними захворюваннями, такими як хвороба Альцгеймера, Паркінсона, ревматоїдний артрит, губчасті енцефалопатії тощо. Про **актуальність** роботи свідчить її зв'язок з державною науковою програмою у рамках держбюджетних тем «Дослідження механізмів формування відгуку біологічних систем та фізичних засад нових методів медичної мікро- та макродіагностики» (№ держреєстрації 0109U001322); «Роль іонів важких металів в мембранних ефектах амілоїдних білків» (№ держреєстрації 0113U005246) Державного фонду фундаментальних досліджень; «Дослідження мембрано-опосередкованих механізмів токсичності преамілоїдних агрегатів білків» (№ держреєстрації 0112U004611) Державного фонду фундаментальних досліджень; «Білок-ліпідні взаємодії як детермінант амілоїдогенних властивостей білків» (№ держреєстрації 0111U008000) Державного фонду фундаментальних досліджень; «Нові підходи до детектування та модуляції процесу утворення амілоїдних фібрил» (проект № 4534) Українського науково-технологічного центру.

Робота складається зі вступу, семи розділів, висновків, списку використаних джерел та додатку.

У вступі наведено всі необхідні формальні дані.

У першому розділі детально подаються літературні відомості про сучасний стан проблеми у досліджуваній темі. Описано, яку роль виконують білок-

ліпідні взаємодії у процесах утворення білкових ансамблів, зокрема амілоїдних фібрил, що складаються з лінійних β -складчастих агрегатів та стабілізуються водневими зв'язками. Розглядаються можливі біотехнологічні застосування амілоїдних структур, виходячи з їх унікальних механічних властивостей. На основі аналізу літературних даних виявлено низку невирішених питань та обрано актуальні задачі для досліджень, а саме, розробити нові методичні підходи щодо детектування та характеристики процесу утворення амілоїдів на ліпідних структурах, та побудувати цілісну систему уявлень процесу фібрилізації білків у мембранному оточенні.

У другому розділі детально описані методи дослідження та подана характеристика зразків. В роботі були використані модельні мембрани у вигляді моношарів, бішарів та ліпосом, що складаються з фосфатидилхоліну (ФХ), фосфатидилгліцеріну (ФГ), фосфатидилсерину (ФС), кардіоліпіну (КЛ), стерол холестерину (Хол). Білкові системи були представлені лізоцимом, цитохромом *c*, мутантами N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I (Апо-I 83). Флуоресцентними зондами були Тіофлавін Т, флуоресцеїн Ф1, пірен, продан, лаурдан, білки та інші барвники.

В роботі використана флуоресцентна спектроскопія, включаючи часороздільну моду та моду повного внутрішнього відбивання, трансмісійна електронна та атомно-силова мікроскопія (АСМ), динамічне світлорозсіяння, моделювання методом молекулярної динаміки, статистична обробка інформації.

У розділі 3 подано новий підхід до характеристики структури білків при утворенні амілоїдів з використанням люмінесцентних методів. Для цього було використано зонди донорно-акцепторної пари, а саме, скварайновий зонд SQ-1 та поліметиновий V2, що зв'язуються з фібрилами лізоциму, та виміряно індуктивно-резонансний перенос енергії (ІРПЕ). Показано, що донори та акцептори у фібрилярному оточенні обмежені в рухливості, а об'єм мономера лізоциму у фібрилі складає 12-22 нм. Використовуючи флуоресцеїн (FI) та інші барвники, було показано, що між донором та акцептором перенос енергії не

відбувається у випадку, коли лізоцим у мономерній формі зв'язується з ФХ та ФГ везикулами. При асоціації лізоциму в системі де є ліпіди, спостерігається помітний перенос енергії, параметри якого були розраховані (ефективність переносу енергії, відстань між донором та акцептором, ступінь агрегації лізоциму).

Була встановлена кореляція між гетерогенністю по зарядовому стану ліпідного бішару та агрегацією лізоциму. А саме, додавання лізоциму до нейтральних мембран, яким є ФХ, не змінювало люмінесцентний сигнал від міченого барвником ліпіду, тоді як у випадку лізоциму на КЛ, що є аніонним ліпідом, різко зростав люмінесцентний сигнал та з'являлись нові області яскравого свічення. В результаті дисертантом була висунута гіпотеза про те, що лізоцим індукує утворення планарних ліпідних доменів в областях, де є зарядові стани та з високим вмістом КЛ. А це в свою чергу веде до утворення складчастих багатошарових структур ліпідів відокремлених молекулами лізоциму, що агрегують при зростанні кількості КЛ.

У розділі 4 розглянуто особливості структури ліпідного бішару, які наведені інтермедіатами лізоциму, цитохрому *c* та аполіпопротеїну АІ. Аналіз люмінесцентних спектрів показав, що зв'язування префібрилатів лізоциму з ліпідними мембранами призводить до збільшення ступеня впорядкованості ланцюгів, зменшення вільного об'єму мембрани. Ці ефекти можуть бути результатом дегідратації полярної зони ліпідного бішару. Була досліджена взаємодія цитохрому *c* з везикулами і показано, що структура ліпідного бішару є складною функцією вмісту КЛ, концентрації ліпіду та іонної сили.

У розділі 5 було досліджено вплив зрілих фібрил лізоциму та мутантів N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А на модельні мембрани. Як і в попередньому випадку, лізоцим зв'язувався з полярними частинами ліпідів та підвищував щільність пакування ліпідів. На противагу лізоциму, зв'язування аполіпопротеїну А призводило до підвищення ступеня гідратації, та можливого виключення частини ліпідів з мембрани. Наслідком цього є дефрагментація ліпідного бішару, яку можна зменшити додаванням холестеролу. Було показано

також, що при білок-ліпідних взаємодіях відбувається конкуренція амілоїдних фібрил з мономерними формами білка за місця зв'язування, і це контролюється як електростатичними силами, так і специфічними чинниками.

У розділі 6 досліджено топологію амілоїдних фібрил за допомогою атомної силової мікроскопії і знайдено дві їх різні форми. При цьому одна з форм відповідає конфігурації закрученої стрічки (ЗС), а друга - спіральної стрічки (СС). Використовуючи Тіофлавін Т як акцептор, а Лаурдан як донор, була зроблена спроба вивчення структури фібрил на ліпідній матриці та висунута гіпотеза щодо розкручування фібрил в ліпідному оточенні.

Розділ 7 присвячений моделюванню процесу агрегації білків на поверхні мембран. Було встановлено, що при агрегації білків ізотерма адсорбції змінює свою форму і не відповідає ленгмюрівській кривій. На цій основі була розроблена оцінка агрегаційної здатності білків в оточенні ліпідів, а також визначено термодинамічні параметри, що характеризують локалізацію та орієнтацію модельних фібрил лізоциму та аполіпопротеїну АІ. Методом молекулярної динаміки у часовому інтервалі 100 нс показано, що структура білка в ліпідному бішарі характеризується збільшенням вмісту β -форм. На основі модельних уявлень була запропонована модель утворення фібрил лізоциму на мембрані.

У цілому робота Трусової Валерії Михайлівни виконана на високому науковому рівні з застосуванням оригінального технологічного обладнання та складної дослідницької апаратури, що свідчить про високий фаховий рівень здобувача. Основні результати є **новими** і вперше отриманими. Матеріали опубліковані в рейтингових міжнародних журналах та доповідались на численних міжнародних конференціях.

Всі наукові положення та висновки є **обґрунтованими** завдяки повноті отриманих експериментальних та розрахункових даних та порівнянню з результатами інших досліджень.

Достовірність результатів не викликає сумніву оскільки вони отримані з використанням надійних експериментальних методик, ретельно оброблені та проаналізовані.

Текст дисертації та автореферат гарно написані та проілюстровані. **Автореферат** вірно відображає зміст дисертації. Основні результати, що наведено у роботі, вчасно і повністю опубліковано в 32 статтях у фахових вітчизняних та міжнародних журналах (з них 21 стаття у журналах, які індексуються базою даних Scopus, сумарний імпакт-фактор яких складає 48.5), в 2 патентах України та в 25 тезах доповідей. Робота пройшла **апробацію** на міжнародних наукових конференціях.

Разом з тим, робота не позбавлена деяких **недоліків**:

1. Термін «патологічна агрегація білка» мабуть не є дуже вдалим (стор.22 автореферату, стор. 284, 327, 330 дисертації), бо йдеться про агрегацію, яка призводить до патологічних змін в організмі, запускаючи низку нових процесів. Білок має інший конформаційний склад, який можна отримати при певних зовнішніх умовах. Терміни «нормальний» і «патологічний» мають відношення до процесу, що відбувається в живому, а не до модельних перетворень білка.

2. У розділі 6 методом АСМ було знайдено 2 різних конформаційних стани амілоїду - закручена стрічка та спіральна стрічка. Взагалі, одного методу не достатньо, щоб робити такі висновки – бажано мати підтвердження, отримане з інших експериментів. Достовірним здається те, що при скануванні в горизонтальному напрямку структура білка складається з бусинок. При вертикальному розташуванні амілоїду цього отримати практично не можливо. Тому викликає сумнів, що 2 амілоїди, представлені в авторефераті (стор 19) та дисертації (стор. 241), дійсно відрізняються. Багато структур, що досліджуються при горизонтальному скануванні методом АСМ (білки, ДНК, нанотрубки) - мають подібну структуру, що це є методичною особливістю сканування в горизонтальному напрямку і не завжди має відношення до характеристики структури (див. роб. Beyond the Helix Pitch: Direct Visualization

of Native DNA in Aqueous Solution, Shinichiro Ido, etc, ACS Nano V. 7, N. 2, 1817–1822 2013; Atomic Force Microscopy with Nanoscale Cantilevers Resolves Different Structural Conformations of the DNA Double Helix, Carl Leung, etc., Nano Lett. 2012, 12, 3846–3850).

3. Одним з методів, що добре розрізняє конформаційні стани біологічних макромолекул, є коливальна спектроскопія, а саме, інфрачервона спектроскопія. Цей метод дозволяє досить легко і швидко, не використовуючи барвників, визначити зміни в конформаційному стані білкових молекул та появу антипаралельної β -форми, що є характеристикою фібрилізації лізоциму, як наприклад. Звичайно, було б непогано застосувати і цей метод в даному дослідженні. Це б дало можливість підтвердити чи спростувати АСМ дані, наприклад.

4. Не зрозумілою є теорія масштабованих частинок (стор.23 автореферату) та стор.283 дисертації). Білок як при адсорбції, так у вільному стані, як правило містить у своєму складі не одну конформаційну форму, а декілька.

5. Відсутні роки виконання держбюджетних тем (стор. 3 автореферату, стор. 14-15 дисертації).

6. В роботі є невдалі вислови, смислові неточності та граматичні помилки. Так, не завжди правильно відмінюються слова у родовому відміннику - повинно бути «донора» та «акцептора» (стор.15 автореферату, стор. 69, 73, 74, 82,83, 91, 95 дисертації і далі), в українській мові мабуть не має слова «здогадно» (стор. 83, 89, 119, 138, 142, 169, 170, 189, 207, 237, 272, 274, 277, 314-316), «повне внутрішнє відбиття» краще замінити на «повне внутрішнє відбивання» (стор.69), «аргонний лазер» на «аргоновий лазер» (стор.69), «мембранов'язані білки» (стор.22 автореферату) на «мембранозв'язані» тощо.

Але наведені зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи у цілому. Дисертаційна робота Трусової Валерії Михайлівни «Білок-ліпідні взаємодії як модулятор агрегаційної поведінки білків» є завершеною науковою працею, в якій отримано вагомий внесок у

вирішення однієї з актуальних проблем біофізики - встановлення ролі білок-ліпідних взаємодій в процесі агрегації білка, що призводить до патологічних процесів в живому організмі.

За обсягом проведених досліджень, якістю, новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертаційна робота Трусової Валерії Михайлівни повністю задовольняє вимогам ВАК України щодо докторських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

провідний науковий співробітник
відділу фізики біологічних систем
Інституту фізики НАН України,
доктор фізико-математичних наук, професор,

Довбешко Г.І.

