

ОТЗЫВ

о диссертации Трусовой В.М. «Белок-липидные взаимодействия как модулятор агрегационного поведения белков», представленной на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика

Диссертация посвящена одной из актуальных проблем современной биофизики – исследованию молекулярных механизмов белок-липидных взаимодействий, приводящих к появлению в организме человека амилоидных фибрилл, которые вызывают конформационные заболевания (болезни Альцгеймера, Паркинсона, ревматоидный артрит и др.). С другой стороны, амилоидные фибриллы являются перспективными нанопереносчиками для контролируемой доставки лекарственных препаратов. Имея уникальные свойства, амилоидные фибриллы находят применение в электронной технике. Используя большой арсенал экспериментальных и теоретических методов, диссертантка провела комплексное исследование взаимодействия ряда белков и пептидов в мономерной, олигомерной и фибриллярных формах с модельными липидными мембранами разного состава. Кроме этого, были разработаны новые методические подходы к дифференциации разных стадий агрегации белка в водной и липидной фазах. Полученные в работе результаты создали основу для более глубокого понимания молекулярных механизмов цитотоксического действия амилоидных фибрилл и разработки новых эффективных стратегий предотвращения развития конформационных патологий.

Диссертационная работа выполнялась на протяжении 8 лет в рамках пяти госбюджетных тем, а также тем государственного фонда фундаментальных исследований согласно планам научной деятельности кафедры ядерной и медицинской физики Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина.

Рецензируемая диссертация оформлена согласно требованиям действующего законодательства Украины и постановлениям Министерства образования и науки: начинается с краткого введения, в котором обсуждаются актуальность, цели и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость работы. Подробно описан личный вклад соискателя в опубликованных с соавторами работах. В обзорной части, посвященной анализу литературных данных, подробно рассмотрена роль белок-липидных взаимодействий в модуляции агрегационного поведения белковых молекул. Автор диссертации подробно рассмотрены молекулярные основы агрегации полипептидов, а также охарактеризованы физические свойства амилоидных фибрилл.

На основе критического анализа современного состояния исследований фибриллярных белковых агрегатов, автор диссертации справедливо подчеркнуто, что накопленные в настоящее время данные не позволяют построить целостную систему представлений о процессе фибриллизации белков в мембранном окружении. В конце обзора автор диссертации обоснованно указал на круг нерешенных вопросов, связанных с проблемой липид-индуцированного амилоидогенеза. Мотивированно обоснована необходимость более глубокого изучения проблем, связанных с разработкой новых методических подходов к детектированию, характеристике и модуляции процесса образования амилоидов на липидных матрицах.

Объектом исследования были комплексы модельных липидных мембран (липидные монослои, бислои на подложке и липосомы) с белковыми ансамблями лизоцима, цитохрома *c* и ряда мутантов N-терминального фрагмента аполипопротеина A-I разной степени полимеризации. Амилоидные фибриллы получали с использованием известных методик. Контроль за их структурой осуществлялся с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и флуоресцентной спектроскопии. В работе использовались три флуоресцентные зонда для белков и шесть зондов для липидов.

Для получения сведений о характере белок-липидных взаимодействий автор диссертации удачно использовал широкий набор экспериментальных и расчетных методов. Среди экспериментальных методов отмечу различные модификации флуоресцентной спектроскопии (метод флуоресцентных зондов, индуктивно-резонансный перенос энергии, тушение флуоресценции, анизотропия флуоресценции) и микроскопии (флуоресцентная, электронная и атомно-силовая). При этом использовались современные приборы ведущих мировых фирм. Основными методами компьютерного моделирования являлись численное моделирование в среде MathCad и молекулярно-динамическая симуляция. Таким образом, можно констатировать, что методический уровень работы отвечает высоким требованиям и гарантирует достоверность полученных экспериментальных и расчетных результатов.

Результативная часть диссертации изложена в последующих пяти разделах. Третий раздел диссертации посвящен развитию новых флуоресцентных подходов для идентификации и характеристики структуры белковых ассоциатов с разной степенью агрегации. Это является несомненной заслугой автора диссертации. С использованием новых амилоид-специфичных красителей на основе измерений эффективности индуктивно-резонансного переноса энергии диссертанту удалось оценить структурные параметры амилоидных фибрилл лизоцима – молекулярный объем мономерных субъединиц и фрактальную размерность агрегатов белка.

На основе комбинированного использования ИРПЭ (стационарного, время-разрешенного и с задержкой импульса возбуждения) автором разработана новая методика оценки степени олигомеризации белков на мембранной матрице. Впервые удалось определить степень агрегации лизоцима, расстояние между мономерами в агрегате и предложить структурную модель белковых олигомеров.

Интересные качественные результаты получены автором при исследовании взаимодействия лизоцима с липидными бислоями с помощью флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения. Впервые

показана трансформация планарных доменов в мультислойные стопки при повышении электростатического потенциала мембраны.

Весомый вклад в проблему исследования молекулярных механизмов цитотоксического действия амилоидов автор внес при изучении закономерностей влияния фибриллярных интермедиатов и зрелых фибрилл лизоцима, цитохрома *c* и различных вариантов аполипопротеина А-I на структурно-динамические и физико-химические свойства модельных мембран. При этом использовались классические мембранные зонды, которые обычно применяются для анализа динамических свойств бислоя. Убедительно показано, что олигомеры белка характеризуются более выраженным структурно-модифицирующим действием, по сравнению с фибриллами. Установлено, что олигомерный лизоцим снижает степень гидратации, уменьшает свободный объем гидрофобной зоны бислоя и увеличивает параметр порядка ацильных цепей липидов. Однако фибриллярный белок изменяет структуру только полярной области модельных мембран и вызывает дегидратацию липидного бислоя.

Наиболее весомые доказательства действия фибрилл лизоцима и разных мутантов N-терминального фрагмента аполипопротеина А-I на мембраны автор приводит в пятом разделе диссертации. На основе метода монослоев Ленгмюра, автор надежно установил увеличение поверхностного давления при адсорбции фибриллярного лизоцима на модельных липидных мембранах. Проведенный теоретический анализ процесса сорбции белков на липидных монослоях в рамках теории адсорбции Фрумкина позволил автору продемонстрировать зависимость изменений поверхностного давления от вкладов сил отталкивания и притяжения между белками и липидами. Впервые установлено, что конкуренция между фибриллярными и мономерными белками за мембранные центры связывания контролируется электростатическими и гидрофобными взаимодействиями.

Показано также, что фибриллярные агрегаты аполипопротеина А-I при взаимодействии с модельными мембранами из фосфатидилхолина и его

смесей с холестерином приводят к увеличению степени гидратации бислоя. На основе данных флуоресцентной спектроскопии и электронной микроскопии автор справедливо предложил модель дестабилизации структуры мембран под действием фибрилл аполипопротеина А-I, которая включает утоньшение, инвагинацию и дефрагментацию липидного бислоя.

Выяснение влияния белок-липидных взаимодействий на топологию фибриллярной структуры было проведено автором для одного из мутантов аполипопротеина А-I. С помощью атомно-силовой микроскопии автор впервые рассчитал механические параметры (модуль Юнга, персистентную длину и второй момент инерции) закрученной и спиральной форм амилоидных фибрилл данного мутанта. Анализ результатов переноса энергии между мембраносвязанным флуорофором, Лаурданом, и амилоид-специфичным зондом, Тиофлавином Т, методом Монте-Карло позволил установить структурный переход фибриллярного пептида при связывании с липидами из конформации закрученной и спиральной структуры в планарную конфигурацию. Оценка расстояний между донором и акцептором убедительно показала, что β -тяжи амилоидных фибрилл мутанта встраиваются в полярную область бислоя.

Последний раздел диссертации посвящен теоретическому анализу процесса агрегации белков и пептидов на атомном и молекулярном уровне. Отмечу только наиболее яркие и весомые результаты, полученные автором. Проведено численное моделирование процесса адсорбции белков на поверхности мембран в рамках модели адсорбции масштабируемых частиц и теории двойного электрического слоя при варьировании концентрации белка и липидов, степени олигомеризации и заряда белка, содержания анионных липидов, рН и ионной силы. Автору удалось показать, что характерным признаком олигомеризации белка является изменение формы кривых связывания мономеров с Ленгмиоровской на сигмоидную или асимметричную колоколообразную. С помощью метода молекулярной динамики охарактеризована роль липидов в образовании агрегационно-

компетентной конформации лизоцима, цитохрома *c* и аполипопротеина А-I. Проведенный анализ изменений вторичной структуры лизоцима при связывании с липидными бислоями показал, что мембраносвязанное состояние белка характеризуется повышенным содержанием β -структур. Автор получил доказательства частичного разворачивания молекулы лизоцима на липидной матрице, показано, что электростатические и гидрофобные взаимодействия являются основными детерминантами мембранно-опосредованной агрегации белка. Все это позволило автору впервые предложить аргументированную модель нуклеации амилоидных фибрилл лизоцима.

Оценивая работу в целом, отмечу, что автором диссертации выполнено развернутое и законченное экспериментальное и теоретическое исследование одной из актуальных проблем молекулярной биофизики – установление роли белок-липидных взаимодействий в процессе патологической агрегации белков. С использованием широкого набора экспериментальных и теоретических методов проведено комплексное исследование взаимодействия белков и пептидов в мономерной, олигомерной и фибриллярной формах с модельными липидными мембранами. Разработаны новые методические подходы к дифференциации разных стадий агрегации белка в водной и липидной фазах. Полученные результаты закладывают основу глубокого понимания молекулярных механизмов цитотоксического действия амилоидных фибрилл, что позволяет разработать новые эффективные методы предотвращения развития конформационных патологий.

В заключение выскажу некоторые замечания, возникшие при ознакомлении с диссертацией В.М. Трусовой:

1. В тексте диссертации не везде присутствуют ссылки на собственные работы, что при чтении затрудняет понимание вклада автора в полученные результаты.

2. Утверждать, что между протонодонорными группами белка и карбонильной группой Продана образуются водородные связи не корректно (стр. 143), поскольку нет прямых доказательств, которые обычно получают с помощью РСА и ИК-спектроскопии.
3. Утверждать, что неизменность вибронной структуры пирена (стр. 127) при добавлении лизоцима к липидным везикулам не изменяет гидратацию гидрофобной области липидного бислоя нет основания, поскольку отсутствуют прямые доказательства степени гидратации мембраны.
4. В диссертации обсуждается деконволюция спектров зондов. Однако, как известно, такое разложение спектров неоднозначно, поэтому сделанные выводы только на таком разложении могут быть неверными, если не учитывать другие доказательства.
5. В тексте диссертации имеются технические недостатки, например, на рис. 4.1 не обозначены пики флуоресценции пирена. В табл. 3.3 не указана погрешность при определении степени агрегации белка и расстояния между мономерами.

Высказанные замечания не затрагивают основных результатов работы и не влияют на ее общую высокую оценку. Полученные результаты имеют фундаментальный характер, являются новыми, научно обоснованными и в большинстве случаев впервые полученные, а проведенные в работе исследования выполнены на высоком уровне. Диссертация написана ясным языком, хорошо иллюстрирована, список цитируемой литературы отражает основные работы по изучаемой проблеме.

Основные результаты диссертации опубликованы в 59 научных работах, в том числе в 32 статьях в научных международных (25 статей) и отечественных (7 статей) изданиях, из которых 8 статей без соавторов, 25 тезисах международных и отечественных конференций и 2 патентах Украины. Суммарный импакт-фактор публикаций составляет 48.5.

На основании вышеизложенного считаю, что представленная диссертационная работа Валерии Михайловны Трусовой соответствует требованиям действующего законодательства Украины и постановлениям Министерства образования и науки Украины о порядке присвоения ученой степени доктора физико-математических наук, а В.М. Трусова заслуживает присуждения ей искомой ученой степени.

Официальный оппонент,
старший научный сотрудник
отдела биофизики Института
радиофизики и электроники
имени А.Я. Усикова НАН Украины,
доктор физико-математических наук,
профессор



/М.А. Семенов/

Подпись М.А. Семенова удостоверяю:

Ученый секретарь Института
радиофизики и электроники
имени А.Я. Усикова НАН Украины,
кандидат физико-математических наук



/И.Е. Почанина/

11 апреля 2016 г.