

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Т.Б. Станишневой-Коноваловой «Регуляция динамики мембран F-BAR-доменным белком Nervous wreck», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика

В диссертации Т.Б. Станишневой-Коноваловой изучались взаимодействия F-BAR-доменного белка Nervous wreck (Nwk) с бислойными мембранами, образованными фосфолипидами. Не вызывает сомнения актуальность и важность этого исследования. Клеточные мембраны формируют пространственную структуру клетки, регулируют межклеточные взаимодействия и обмен сигналами с помощью многочисленных рецепторных белков, встроенных в липидное окружение. Однако структурный анализ интактных клеточных мембран методически сложен, и наиболее интересные результаты о взаимодействиях белков и липидов в мембранах дают модельные системы. Подобной работой является диссертация Т.Б. Станишневой-Коноваловой. На первом этапе работы диссертант охарактеризовал методами молекулярной динамики свойства липидных бислоев разного состава и определил аминокислотные остатки F-BAR-доменов, участвующие в связывании с мембранами. Электронная микроскопия позволила выявить олигомерные структуры, сформированные F-BAR-доменами на поверхности клеток, и предложить новый механизм формирования трубочек в клеточных мембранах. Наиболее важным результатом работы, по моему мнению, является построение пространственных моделей полноразмерного белка Nwk в свободном и в связанном с мембраной состояниях на основе разностных микроскопических карт. Представленные в автореферате рисунки убедительно подтверждают предложенную в работе модель взаимодействия белка Nwk с мембраной и сопряженных структурных перестройках в белке. Особенно хочется отметить высокий методический уровень работы, использование различных методов молекулярной динамики, высокоразрешающей электронной микроскопии и молекулярного моделирования. Автореферат написан хорошим литературным языком, логично построен и хорошо отражает результаты работы. В целом, автореферат диссертации Т.Б. Станишневой-Коноваловой свидетельствует о полном соответствии работы требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842). Ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

119334 Россия, Москва,
ул. Вавилова, д. 26
8(499)1358847
mikhailov48@mail.ru



Михайлов Виктор Сергеевич,
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН.

Подпись В.С. Михайлова заверяю
Ученый секретарь ФГБУН ИБР РАН
Кандидат биологических наук



Хабарова Марина Юрьевна

Личные данные рецензента

Михайлов Виктор Сергеевич

доктор биологических наук, профессор

Место работы:

главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН).

119334 Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 26

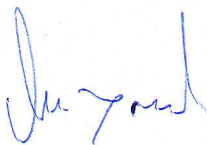
Тел: 8(499)1358847,

E-mail: mikhailov48@mail.ru

Основные публикации по теме диссертанта (2-3 за последние 5-7 лет):

1. Lyupina Y.V., Dmitrieva S.B., Timokhova A.V., Beljelarskaya S.N., Zatsepina O.G., Evgen'ev M.B., Mikhailov V.S. An important role of the heat shock response in infected cells for replication of baculoviruses. Virology, 2010, v. 406, N 2, 336-341;
2. Lyupina Y.V., Zatsepina O.G., Timokhova A.V., Orlova O.V., Kostyuchenko M.V., Beljelarskaya S.N., Evgen'ev M.B., Mikhailov V.S. New insights into the induction of the heat shock proteins in baculovirus infected insect cells. Virology, 2011, v. 421, N 1, 34-41;
3. Lyupina Y.V., Abaturova S.B., Erokhov P.A., Orlova O.V., Beljelarskaya S.N., Mikhailov V.S. Proteotoxic stress induced by Autographa californica nucleopolyhedrovirus infection of Spodoptera frugiperda Sf9 cells. Virology, 2013, v. 436, N 1, 49-58.

18.05.2016



Михайлов В.С.

Заверяю
Ученый секретарь ФГБУН ИБР РАН
Кандидат биологических наук



Хабарова Марина Юрьевна

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Станишневой-Коноваловой Татьяны Борисовны
«Регуляция динамики мембран F-BAR-доменным белком Nervous wreck»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.02 (биофизика)

Работа Станишневой-Коноваловой Т.Б. посвящена изучению механизмов взаимодействия F-BAR-доменного белка Nervous wreck (Nwk) с липидными мембранами. Изучение механизмов функционирования белков, изменяющих свою конформацию является сложной задачей в виду необходимости получения информации о структуре белка, находящегося в различных состояниях. Для этого в данной работе был выбран удачный комплексный подход, включающий в себя взаимодополняющие методы молекулярной динамики и просвечивающей электронной микроскопии. С помощью моделирования по гомологии была построена модель димера F-BAR-доменов Nwk, затем методом молекулярной динамики был изучен процесс связывания димера с мембраной и выявлены наиболее важные в этом процессе аминокислотные остатки. Методом просвечивающей электронной микроскопии впервые были получены структуры полноразмерного белка Nwk, находящегося в двух различных конформациях: в свободном состоянии и связанном с мембраной. Полученные данные впервые позволили предложить механизм взаимодействия Nwk с мембранами клеток, а также выявили новый способ олигомеризации F-BAR-доменного белка на мембране, нетипичный для большинства исследованных до этого F-BAR-доменов.

Рассматриваемые в диссертации вопросы в основном имеют фундаментальную направленность, однако в виду того, что BAR-доменные белки связаны с развитием ряда серьезных неврологических, аутовоспалительных и других заболеваний, полученная в работе информация о механизме их функционирования может быть использована для разработки новых терапевтических агентов.

Кроме безусловных достоинств диссертационной работы, следует отметить наличие и небольших недочетов. В частности, не всегда вовремя приведены расшифровки сокращений и пояснения некоторых специальных терминов, например, таких как «СКО липидов», «SH3-домен» и др. Представленные замечания не влияют на общую положительную оценку работы.

Таким образом, диссертационная работа Станишневой-Коноваловой Татьяны Борисовны «Регуляция динамики мембран F-BAR-доменным белком Nervous wreck» представляет собой завершенное научное исследование высокого уровня и полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук: п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013г. №842), а ее автор достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 (биофизика).

Кандидат биологических наук

Гризель Анастасия Владимировна

«10» июня 2016 г.

Документ подготовлен
вне рамок исполнения
трудовых обязанностей



Подпись *А. В. Гризель*
ЗАВЕРЯЮ
14.06.2016г.

Вишневецкая О.С.

СВЕДЕНИЯ О РЕЦЕНЗЕНТЕ

Гризель Анастасия Владимировна

Кандидат биологических наук

Основное место работы:

Стажер-исследователь (постдок) биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Санкт-Петербургский государственный университет".

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7-9

Телефон: +7 (812) 328-20-00

Основные публикации по теме диссертации:

1. **Grizel A.**, Popinako A., Kasimova M.A., Stevens L., Karlova M., Moisenovich M., Sokolova O.S., Domain Structure and Conformational Changes in rat Kv2.1 ion Channel. Journal of Neuroimmune Pharmacology. 2014; 9(5):727-39.
2. **Grizel A.V.**, Glukhov G.S., Sokolova O.S., Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. Acta Naturae. 2014; 6(4):10-26.
3. Sokolova O.S., Shaïtan K.V., **Grizel' A.V.**, Popinako A.V., Karlova M.G., Kirpichnikov M.P., Three-dimensional structure of human Kv10.2 ion channel studied by single particle electron microscopy and molecular modeling. Bioorg Khim. 2012; 38(2):177-84.
4. Karlova M.G., **Pishchal'nikova A.V.**, Ramonova A.A., Moïsenovich M.M., Sokolova O.S., Shaïtan K.V. In vitro fluorescence assay to study the folding of Kv ion channels. Biofizika. 2011; 56(2):272-9.
5. **Pischalnikova A.V.**, Sokolova O.S. The domain and conformational organization in potassium voltage-gated ion channels.// Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2009; 4(1): 71-82

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Станишневой-Коноваловой Татьяны Борисовны на тему: «Регуляция динамики мембран F-BAR-доменным белком NERVOUS WRECK», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 (биофизика).

Связь третичной структуры, конформационных изменений различных белков с их функцией всегда была предметом особого внимания биофизики, молекулярной биологии и биоинженерии. В настоящий момент существует целый арсенал методов и их модификаций, позволяющий изучать структуру белка (рентгеноструктурный анализ, ядерно-магнитный резонанс, электронная микроскопия, малоугловое рентгеновское рассеяние, различные вариации инфракрасной и рамановской спектроскопии). Однако, несмотря на очевидный методологический прогресс в данной области, структура далеко не всех белков может быть изучена прямыми экспериментальными методами. Это может быть связано с целым рядом факторов: сложность выделения чистого белка в достаточных количествах, проблемы пробоподготовки (например, невозможность кристаллизации) и т.п. Методы молекулярной динамики органично дополняют экспериментальные методы, позволяя получить ценную информацию о структуре и динамике белков на атомарном уровне без физического наличия исследуемого объекта.

В работе соискательницы кандидатской степени разумно сочетаются методы просвечивающей электронной микроскопии и молекулярного моделирования для исследования структуры F-BAR-доменного белка NERVOUS WRECK. Структурные исследования регуляции динамики мембран F-BAR-доменным белком NERVOUS WRECK являются весьма востребованными, поскольку от уровня экспрессии или мутации в генах, кодирующих BAR-доменные белки, зависит развитие ряда серьезных неврологических и аутовоспалительных заболеваний, инвазивных опухолей. Предложенные теории регуляции динамики мембран F-BAR-доменным белком NERVOUS WRECK имеют практическую значимость при разработке новых способов борьбы с данными заболеваниями.

Результаты работы Татьяны Борисовны опубликованы в реферируемых научных журналах (включая рекомендованные ВАК), а также доложены на научных конференциях. Принципиальных замечаний по самой работе и по ее оформлению нет. Есть пожелание использовать термин «траектория» с большей осторожностью.

Диссертационная работа Станишневой-Коноваловой Татьяны Борисовны является законченной работой, которая полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук: п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013г. №842), а ее автор достоин присуждения искомой ученой степени.

Старший научный сотрудник
ФИЦ «Биотехнологии» РАН, к.б.н.

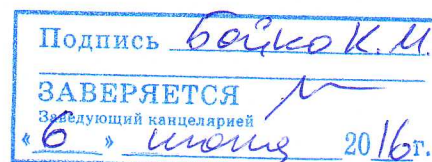
«6» июня 2016 г.



Бойко Константин Михайлович

Адрес: 119071, город Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2 Телефон: (495) 954-5283

E-mail: inbi@inbi.ras.ru



СВЕДЕНИЯ О РЕЦЕНЗЕНТЕ

ФИО - Бойко Константин Михайлович

Ученая степень – кандидат биологических наук

Шифр и наименование специальности - 03.00.04 – Биохимия

Должность - старший научный сотрудник

Место и адрес работы - ФИЦ «Биотехнологии» РАН, 119071, город Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2 Телефон: (495) 954-5283

Телефон, e-mail - 8(495)-952-3441, boiko_konstantin@inbi.ras.ru

Перечень опубликованных работ

- 1: Boyko KM, Polyakov KM, Tikhonova TV, Slutsky A, Antipov AN, Zvyagilskaya RA, Bourenkov GP, Popov AN, Lamzin VS, Popov VO. Crystallization and preliminary X-ray analysis of cytochrome c nitrite reductase from *Thioalkalivibrio nitratireducens*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2006 Mar 1;62(Pt 3):215-7. Epub 2006 Feb 10. PubMed PMID: 16511304; PubMed Central PMCID: PMC2197178.
- 2: Polyakov KM, Boyko KM, Tikhonova TV, Slutsky A, Antipov AN, Zvyagilskaya RA, Popov AN, Bourenkov GP, Lamzin VS, Popov VO. High-resolution structural analysis of a novel octaheme cytochrome c nitrite reductase from the haloalkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio nitratireducens*. *J Mol Biol*. 2009 Jun 26;389(5):846-62. doi: 10.1016/j.jmb.2009.04.037. Epub 2009 Apr 23. PubMed PMID: 19393666.
- 3: Trofimov AA, Polyakov KM, Boyko KM, Tikhonova TV, Safonova TN, Tikhonov AV, Popov AN, Popov VO. Structures of complexes of octaheme cytochrome c nitrite reductase from *Thioalkalivibrio nitratireducens* with sulfite and cyanide. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Oct;66(Pt 10):1043-7. doi: 10.1107/S0907444910031665. Epub 2010 Sep 18. PubMed PMID: 20944237.
- 4: Trofimov AA, Polyakov KM, Tikhonova TV, Tikhonov AV, Safonova TN, Boyko KM, Dorovatovskii PV, Popov VO. Covalent modifications of the catalytic tyrosine in octaheme cytochrome c nitrite reductase and their effect on the enzyme activity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2012 Feb;68(Pt 2):144-53. doi: 10.1107/S0907444911052632. Epub 2012 Jan 13. PubMed PMID: 22281743.
- 5: Boyko K, Gorbacheva M, Rakitina T, Korzhenevskiy D, Vanyushkina A, Kamashev D, Lipkin A, Popov V. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the histone-like HU protein from *Spiroplasma melliferum* KC3. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2015 Jan 1;71(Pt 1):24-7. doi: 10.1107/S2053230X14025333. Epub 2015 Jan 1. PubMed PMID: 25615963.
- 6: Petrova T, Bezsudnova EY, Boyko KM, Mardanov AV, Polyakov KM, Volkov VV, Kozin M, Ravin NV, Shabalin IG, Skryabin KG, Stekhanova TN, Kovalchuk MV, Popov VO. ATP-dependent DNA ligase from *Thermococcus* sp. 1519 displays a new arrangement of the OB-fold domain. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2012 Dec 1;68(Pt 12):1440-7. doi: 10.1107/S1744309112043394. Epub 2012 Nov 14. PubMed PMID: 23192021; PubMed Central PMCID: PMC3509962.
- 7: Timofeev V, Slutskaya E, Gorbacheva M, Boyko K, Rakitina T, Korzhenevskiy D, Lipkin A, Popov V. Structure of recombinant prolidase from *Thermococcus sibiricus* in space group P21221. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2015 Aug;71(Pt 8):951-7. doi: 10.1107/S2053230X15009498. Epub 2015 Jul 28. PubMed PMID: 26249680.
- 8: Boyko KM, Stekhanova TN, Nikolaeva AY, Mardanov AV, Rakitin AL, Ravin NV, Bezsudnova EY, Popov VO. First structure of archaeal branched-chain amino acid aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* specific for L-amino acids and R-amines. *Extremophiles*. 2016 Mar;20(2):215-25. doi: 10.1007/s00792-016-0816-z. Epub 2016 Feb 12. PubMed PMID: 26872794.
- 9: Boyko KM, Gorbacheva MA, Rakitina TV, Korzhenevsky DA, Dorovatovsky PV, Lipkin AV, Popov VO. Identification of the ligand in the structure of the protein with unknown function STM4435 from *Salmonella typhimurium*. *Dokl Biochem Biophys*. 2014;457:121-4. doi: 10.1134/S1607672914040012. Epub 2014 Aug 30. PubMed PMID: 25172330.

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Станишневой-Коноваловой Татьяны Борисовны
"РЕГУЛЯЦИЯ ДИНАМИКИ МЕМБРАН F-BAR-ДОМЕННЫМ БЕЛКОМ NERVOUS WRECK",
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.02 – биофизика

Изменение кривизны мембраны – чрезвычайно интересный процесс, подробное изучение которого с привлечением теоретических подходов и вычислительных экспериментов началось сравнительно недавно. Работа Татьяны выполнена на современную и актуальную тематику, что отражено во введении автореферата. Объектом исследований Татьяны был BAR-доменный белок Nwk, к изучению которого автор подошел с двух различных позиций: с одной стороны было произведено молекулярно-динамическое исследование взаимодействия Nwk с липидным бислоем, с другой стороны – были произведены трехмерные реконструкции олигомеров исследуемого белка с использованием электронной микроскопии. Такой подход, сочетающий в себе реальный и вычислительный эксперименты, представляется мне чрезвычайно плодотворным.

Поскольку я имею некоторый опыт в моделировании липидных систем, то мои вопросы автору будут касаться только этой части работы:

1) Не ясно, почему автор выбрал для моделирования липид с температурой плавления 40 градусов и проводил моделирование при 50 градусах. Данные условия представляются сильно отдаленными от экспериментальных моделей.

2) Реальные эксперименты производились с липидной системой, состав которой явно моделирует состав внутреннего монослоя эукариотической клетки (PC/PS/PE). В то же время молекулярная динамика производилась на монослое PC/PI. Прокомментируйте, пожалуйста, с чем связан выбор того и другого составов.

3) Время симуляций, используемое Татьяной достаточно короткое – порядка сотни наносекунд. Мне *apriori* это время кажется недостаточным. Можно ли как-то обосновать его достаточность?

4) Немного странным выглядит вывод о том, что “сначала димер связывается с мембраной концевыми участками, а затем центральным регионом на вогнутой поверхности”. На мой взгляд для его обоснования необходим запуск серии параллельных симуляций из разных поворотных начальных конфигураций. Прокомментируйте, пожалуйста, данное положение.

В целом, результаты и выводы, представленные в автореферате выглядят обоснованными. Основные результаты работы опубликованы в хороших зарубежных журналах и доложены на серьезных научных конференциях. Работа полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук: п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013г. №842), а ее автор достоин присуждения искомой ученой степени.

м.н.с. НИИФХБ им. А.Н.Белозерского

МГУ им. М.В.Ломоносова, к.ф.-м.н.

14 июня 2016 г.



А.М. Нестеренко



Сведения о рецензенте

ФИО: Нестеренко Алексей Михайлович

Ученая степень: Кандидат физико-математических наук

Ученое звание: нет

Должность: младший научный сотрудник

Место и адрес работы: Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

Телефон: +7 (095) 939-0338

e-mail: comconadin@gmail.com

Список публикаций по теме диссертации

1. Marukovich N. I., Nesterenko A. M., Ermakov Y. A. Structural factors of lysine and polylysine interaction with lipid membranes // *Biochemistry, Supplemental Series A*. — 2015. — Vol. 9, no. 1. — P. 40–47.
2. Марукович Н. И., Нестеренко А. М., Ермаков Ю. А. СТРУКТУРНЫЕ ФАКТОРЫ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ЛИЗИНА И ПОЛИЛИЗИНОВ С ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ // *Биологические мембраны*. — 2014. — Т. 31, № 6. — С. 401–409.
3. Interaction of polylysines with the surface of lipid membranes: The electrostatic and structural aspects / N. Marukovich, M. McMurray, O. Finogenova et al. // *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. — 2013. — Vol. 17. — P. 139–166.
4. Нестеренко А. М., Ермаков Ю. А. Молекулярная динамика фосфолипидных мембран: распределение ионов вблизи границы нейтрального и заряженного жидкокристаллического бислоя // *Биологические мембраны*. — 2012. — Т. 29, № 5. — С. 374–384.
5. Нестеренко А. М., Красильников П. М., Ермаков Ю. А. Молекулярно-динамическая симуляция бислоя dppc в разных фазовых состояниях: гидратация и распределение электрического поля в присутствии катионов Be^{2+} // *Биологические мембраны*. — 2011. — Т. 28, № 5. — С. 397–407.