

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права
УДК 577.112+577.322.7

ПОБОЙНЕВ
Виктор Витольдович

**ВЫЯВЛЕНИЕ УЧАСТКОВ БЕЛКОВ, СКЛОННЫХ
К ОПРЕДЕЛЁННЫМ ТИПАМ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕХОДОВ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Гродно 2023

Работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: **Хрусталёв Владислав Викторович,**
доктор биологических наук, доцент,
заведующий кафедрой общей химии учреждения
образования «Белорусский государственный
медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Макарчиков Александр Фёдорович,**
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой химии учреждения
образования «Гродненский государственный
аграрный университет»

Чиркин Александр Александрович,
доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры химии и естественнонаучного
образования учреждения образования «Витебский
государственный университет им. П. М. Машерова»

Оппонирующая организация: государственное научное учреждение «Институт
биофизики и клеточной инженерии Национальной
академии наук Беларуси»

Защита состоится 22 ноября 2023 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.30.01 при республиканском научно-исследовательском унитарном предприятии «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 230023, г. Гродно, пл. Антония Тызенгауза, 7; e-mail: office@ibiochemistry.by, тел/факс: 8(0152) 55-87-78.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан 19 октября 2023 года.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций
кандидат биологических наук, доцент



И. П. Сутько

ВВЕДЕНИЕ

Протеом человека на 30–40% состоит из внутренне неупорядоченных белков (IDPs) [Colak R. et al., 2013]. Около 50% всех белков млекопитающих содержат длинные (более 30 аминокислотных остатков) неупорядоченные фрагменты (IDPRs), а около 25% относятся к группе полностью неупорядоченных белков [Dunker A. K. et al., 2008]. Отсутствие стабильной пространственной структуры позволяет таким белкам выполнять важнейшие биологические функции, такие как сигналинг, катализ, молекулярное распознавание, а следовательно, участвовать в регуляции биохимических и физиологических процессов [Cortese M. S. et al., 2008; Wright P. E., Dyson H. J., 2015]. На сегодняшний день выделяют целые группы болезней, ассоциированных с IDPs: сердечно-сосудистые заболевания, рак, амилоидоз, нейродегенеративные заболевания, сахарный диабет [Uversky V. N. et al., 2008], так как IDPs играют ключевую роль в патогенезе этих заболеваний [Wang J. et al., 2011]. Однако экспериментально определить различные конформации белка в живой клетке на данный момент затруднительно, в связи с чем огромный интерес представляют собой компьютерные алгоритмы для обнаружения фрагментов, склонных к структурным переходам. При этом, даже несмотря на достижения в развитии вычислительной биологии, IDPs являются в большей степени непредсказуемыми [Necci M. et al., 2021]. Поэтому создание принципиально нового метода обнаружения фрагментов белков, способных переходить во внутренне неупорядоченное состояние, является актуальной задачей биохимии.

Точный механизм влияния известных аминокислотных замен, приводящих к развитию прионных болезней, на структуру прионного белка до сих пор не установлен. На сегодняшний день отсутствует вакцина против парвовирусной инфекции, способной приводить к внутриутробной гибели плода [Чистенко Г. Н. и др., 2015; Ермолович М. А. и др., 2019]. Строение подмембранной части гемагглютинаина пандемического вируса гриппа А/Н1N1 на сегодняшний день не установлено, так же как не установлена и архитектура его комплекса с матриксным белком М1, который играет ключевую роль в процессе сборки новых вирусных частиц [Höfer C. T. et al., 2019].

Данное исследование включило в себя создание нового метода определения фрагментов белков, склонных к определённым структурным переходам, его применение к анализу структуры большого прионного белка человека, минорного капсидного белка парвовируса В19 и гемагглютинаина вируса гриппа, строение подмембранного домена которого впервые определено экспериментально.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами и темами

Тема диссертационной работы соответствует подразделам 3. Биологические системы и технологии, 4. Медицина и фармация и 12. Междисциплинарные исследования приоритетных направлений научных исследований на 2016–2020 гг., утверждённых постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 г. № 190. Тема диссертационной работы соответствует разделу 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства приоритетных направлений научных, научно-технических и инновационных исследований на 2021–2025 гг., утверждённых указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156.

Диссертация выполнялась в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» (УО «БГМУ») в рамках международного Гранта БРФФИ и РФФИ «Поиск новых способов блокады проникновения вируса гриппа в клетку на этапе слияния мембран и дезинтеграции матрикса» (№ гос. регистрации 20181247, срок выполнения 2018–2020 гг.); ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», задание «Изучить антигенные свойства оригинальных синтетических пептидов для иммунопрофилактики и иммунодиагностики заболеваний, вызываемых парвовирусом В19» (№ гос. регистрации 20210605, срок выполнения 2021–2023 гг.); НИР «Изучение особенностей лиганд-рецепторных взаимодействий с помощью разработанного способа выявления участков белков с нестабильной вторичной структурой» (№ гос. регистрации 20210135, срок выполнения 2021–2025 гг.).

Цель, задачи, объект и предмет исследования

Цель исследования: разработка и применение метода выявления внутренне неупорядоченных фрагментов белков с использованием данных об их вторичной и третичной структуре.

Задачи исследования:

1. Разработать новый метод анализа фрагментов белков, склонных к определённым структурным переходам, выявить особенности аминокислотного состава и особенности комбинаций аминокислотных остатков в таких фрагментах белков.

2. Разработать алгоритм, позволяющий выявлять фрагменты в белках, склонные к переходу в определённый элемент вторичной структуры, а также к переходу во внутренне неупорядоченное состояние, провести сравнение с имеющимися аналогами, применить разработанный алгоритм к подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1,

большому прионному белку человека, минорному капсидному белку парвовируса В19.

3. Определить экспериментально вторичную, третичную и четвертичную структуру пептидов, соответствующих подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1.

4. Установить роль структурной изменчивости подмембранной части гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1 в его взаимодействиях с матриксным белком М1 при рН=7,4 и при рН=5,0, предложить трипептиды, способные нарушить данные взаимодействия.

Объект исследования: трёхмерные структуры белков – представителей всех структурных классов; трёхмерные структуры большого прионного белка человека, сывороточного альбумина человека, минорного капсидного белка парвовируса В19, матриксного белка М1 вируса гриппа А/Н1N1; синтетические пептиды, соответствующие подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1.

Предмет исследования: структурные переходы в белках и пептидах, образование связей внутри молекул белка и между молекулами белка и лигандами, спектры кругового дихроизма, инфракрасные спектры белков, электрофореграммы, спектры флуоресценции остатков триптофана.

Научная новизна

Впервые доказано наличие различий в аминокислотных последовательностях стабильных альфа-спиралей и бета-тяжей от аналогичных элементов вторичной структуры, способных к переходу в петли или во внутренне неупорядоченное состояние.

Впервые разработан алгоритм, способный по известной 3D структуре белка с учётом вторичной структуры и внутримолекулярных взаимодействий определять фрагменты белков, склонные совершать разные типы структурных переходов.

Впервые установлена вторичная структура подмембранной части гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1.

Впервые получены модели комплексов пептида, соответствующего подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1, с матриксным белком М1 при рН=7,4 и при рН=5,0.

Выявлен третий в мировой практике пример белка, имеющего максимум флуоресценции при 308 нм после возбуждения при 270–295 и 220–230 нм.

Предложен уникальный пептид для иммунопрофилактики парвовирусной инфекции и уникальные трипептиды, способные препятствовать разборке и правильной сборке вирионов вируса гриппа А/Н1N1.

Положения, выносимые на защиту

1. Альфа-спиральные и бета-структурные фрагменты полипептидных цепей, способные к переходу в петли, отличаются более высокой частотой использования гидрофильных аминокислотных остатков, глицина, цистеина и пролина, в то время как альфа-спирали и бета-тяжи, способные к переходу во внутренне неупорядоченное состояние, обогащены аланином, метионином, аспарагиновой кислотой и лизином. Различия в аминокислотном составе стабильных петель в сравнении с внутренне неупорядоченными фрагментами заключаются в повышенном содержании остатков лейцина, изолейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, цистеина, гистидина, и в пониженном содержании серина и глутаминовой кислоты.

2. Оригинальный вероятностный алгоритм PentUnFOLD способен к определению фрагментов белков, склонных к переходу в другие типы элементов вторичной структуры, а также во внутренне неупорядоченное состояние, с показателями эффективности, превышающими таковые для известных аналогов.

3. Цитоплазматический домен гемагглютинаина вируса гриппа A/H1N1 не способен к переходу во внутренне неупорядоченное состояние, образует бета-шпильку, длиной от 4 до 8 аминокислотных остатков, с гидрофильной петлёй. Пептиды W14 и F15, соответствующие цитоплазматическому домену гемагглютинаина вируса гриппа A/H1N1, в водном растворе при pH=7,4 образуют олигомеры от 3 до 6 порядка, формируют внутримолекулярную антипараллельную бета-структуру как при pH=7,4, так и при pH=5,0, в восстановленном и в окисленном состоянии, что подтверждается нахождением некоторых остатков триптофана в олигомерах пептида F15 в абсолютно гидрофобном микроокружении.

4. Матриксный белок M1 вируса гриппа A/H1N1 взаимодействует с подмембранной частью гемагглютинаина этого же вируса и формирует два разных типа комплексов при pH=7,4 и при pH=5,0 за счёт изменения структуры обоих белков. Формилированные трипептиды NTD и NQD способны нарушить формирование этих комплексов.

Личный вклад соискателя

Соискателем совместно с научным руководителем, д.б.н., доцентом Хрусталёвым В. В. выбрана тема диссертации, поставлены цель и задачи, обобщены основные научные результаты. Формирование выборок негомологичных белков четырёх структурных классов, разработка концепции и создание вероятностных шкал оригинального алгоритма PentUnFOLD, его написание, определение показателей качества работы, сравнение с аналогами, анализ структурной нестабильности подмембранного домена гемагглютинаина вируса гриппа, большого прионного белка человека,

сывороточного альбумина человека, минорного капсидного белка парвовируса В19, моделирование трёхмерной структуры подмембранного домена вируса гриппа и оценка её качества осуществлено соискателем лично. Запись спектров кругового дихроизма пептидов и их анализ проведены совместно с к.ф.-м.н. Арутюняном А. М. в лаборатории гемопротеидов НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ имени М. В. Ломоносова. Запись спектров флуоресценции синтетических пептидов, определение температурного тушения флуоресценции проведены совместно с к.б.н. Хрусталёвой Т. А. в многопрофильной диагностической лаборатории Института физиологии НАН Беларуси. Запись и анализ спектров ИК НРВО проведены совместно с сотрудником лаборатории инфракрасной спектроскопии центра физико-химических методов исследования Белорусского государственного технологического университета Сапоном Е. Г. Из совместно опубликованных работ в диссертации представлены результаты, полученные соискателем лично или на паритетных условиях с соавторами: в публикациях [6; 9; 10] личный вклад соискателя – 90%, в [8] – 80%, в [2; 3; 4] – 50%. В публикациях [1; 5; 7] автором выполнены отдельные этапы исследования.

Апробация диссертации и информация об использовании её результатов

Результаты диссертационной работы были представлены на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2018), Международной конференции «Границы биологических наук, сигналинг и метаболизм» (Гродно, 2018), Международной конференции «6th International Influenza Meeting Institute of Virology» (Мюнстер, Германия, 2018), Moscow Conference on Computational Molecular Biology (Москва, Россия, 2019), 44-м FEBS конгрессе (Краков, Польша, 2019), 45-м FEBS конгрессе (Любляна, Словения, 2021), Международной научно-практической конференции «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022), III Белорусском биохимическом конгрессе «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, 2022).

Результаты диссертационной работы используются в научном процессе НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ имени М. В. Ломоносова, в учебном процессе кафедры медицинской и биологической физики УО «БГМУ», в образовательном процессе кафедры высокомолекулярных соединений Белорусского государственного университета (БГУ).

Опубликованность результатов диссертации

По материалам диссертации опубликовано 10 статей (в том числе 6 на английском языке) объёмом 10,72 авт. л. в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых

степеней и присвоении ученых званий, 12 статей в сборниках научных статей и материалов конференций (3,66 авт. л.), 10 тезисов докладов (0,82 авт. л.).

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, основной части, которая представлена обзором литературы (глава 1), описанием материалов и методов (глава 2), основными результатами исследований (главы 3–6), заключения, библиографического списка и 4 приложений (в приложении А представлены 4 акта внедрения). Библиографический список включает 226 наименований литературных источников и 32 публикации соискателя. Текст диссертационной работы изложен на 185 страницах печатного текста и содержит 20 таблиц, 29 рисунков и 20 страниц приложений.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования

Для установления различий между стабильными фрагментами белков и фрагментами, которые могут совершать структурные переходы, а также для создания оригинальных шкал алгоритма PentUnFOLD использовали 4 выборки негомологичных белков эукариот, принадлежащих разным структурным классам, и выборку негомологичных белков бактерий. Информация об аминокислотном составе белков, о третичной структуре взята из Protein Data Bank (PDB). Всего было исследовано 2116 трёхмерных структур полипептидных цепей: 378 структур альфа-спиральных белков эукариот, 355 структур бета-структурных белков эукариот, 387 структур белков эукариот класса «альфа + бета», 386 структур белков эукариот класса «альфа/бета» и 610 структур белков бактерий. Границы альфа-спиралей и бета-тяжей определены алгоритмом DSSP [Kabsch W., Sander C., 1983]. Внутрибелковые взаимодействия определены с помощью алгоритма PIC [Tina K. G. et al., 2007]. В выборку для тестирования алгоритма PentUnFOLD и сравнения его с аналогами вошли 249 структур белков эукариот, прокариот и вирусов, которые были негомологичными для тех, которые использовались при создании шкал алгоритма, и 103 структуры сывороточного альбумина человека.

Для установления консенсусной первичной структуры подмембранного домена гемагглютинаина вируса гриппа А использованы 84 аминокислотные последовательности всех известных на настоящий момент его подтипов. Для установления строения подмембранного домена гемагглютинаина пандемического вируса гриппа А/Н1N1 и его визуализации *in silico* использован ряд программ: PentUnFOLD, DisEMBL, PONDR VSL2, PONDR VLXT, WebLogo, PepFOLD 3.5, I-TASSER, QUARK, SWISS MODEL,

DISULFIND, DiANNA, Isoelectric Point Calculator, Hex 8.0.0, ModRefiner, GalaxyWEB, VADAR, PROCHECK, RasMol.

Для определения строения данного фрагмента гемагглютинина *in vitro* синтезированы четыре пептида, чья аминокислотная последовательность идентична аминокислотной последовательности в полноразмерном белке вируса гриппа: WI14, FI15, WI14-АСМ и FI15-АСМ. Пептид WI14 с аминокислотной последовательностью NH₂-WMCSNGSLQCRICI-COOH соответствует нумерации Trp553–Phe566 в полноразмерном гемагглютинине подтипа H1. Пептид FI15 с аминокислотной последовательностью NH₂-FWMCSNGSLQCRICI-COOH соответствует нумерации Phe552–Phe566 в гемагглютинине того же подтипа. Пептиды FI15-АСМ (NH₂-FWMC(Acm)SNGSLQC(Acm)RIC(Acm)I-COOH) и WI14-АСМ (NH₂-WMC(Acm)SNGSLQC(Acm)RIC(Acm)I-COOH) содержат в своём составе ацетаминометилированные остатки цистеинов, которые включены в состав пептидов вместо цистеинов в процессе их твёрдофазного синтеза, чтобы учесть тот факт, что в вирионе остатки цистеина ацилированы [Kordyukova L. V. et al., 2008]. Степень очистки всех синтезированных пептидов составила более 95% согласно результатам ВЭЖХ с МС.

Вторичную структуру данных пептидов в их насыщенных растворах в фосфатном буфере как при рН=7,4, так и при рН=5,0 определяли с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД) на спектрометре Chirascan. Вторичную структуру пептида WI14 также определяли при помощи инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (ИК НПВО), проведенной при помощи ИК Фурье спектрометра Thermo Nexus 670 FT-IR ESP Nicolet. Спектры флуоресценции четырёх синтетических пептидов и матрицу возбуждения-излучения пептида FI15 регистрировали с помощью спектрофлуориметра SOLAR CM2203. Для определения порядка олигомеров, формируемых синтетическими пептидами в растворе, применили голубой нативный электрофорез и мембранную фильтрацию. Электрофорез проводился в камере Hoefer SE600 с последующей окраской геля серебром. Мембранная фильтрация насыщенного раствора пептида WI14-АСМ в 0,01 М фосфатном буфере при рН=7,4 проводилась при помощи фильтров Amicon Ultra Devices (Merck, США). Растворы синтетических пептидов проверяли на наличие амилоидоподобных фибрилл тестом с Конго красным.

Полученные данные обрабатывали при помощи программ Statistica 10.0, MS Excel и Past 3.0. На соответствие нормальному распределению выборки проверяли критерием Шапиро–Уилка. Различия между частотами встречаемости аминокислотных остатков и пентапептидов в исследуемых выборках белков анализировали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Параметр значимости был установлен на уровне $p < 0,05$.

Особенности аминокислотного состава внутренне неупорядоченных белков

С помощью предложенного универсального метода для выявления фрагментов белков, склонных к структурным переходам, который заключается в сравнении границ элементов вторичной структуры на нескольких 3D структурах одного и того же белка, установлено, что альфа-спирали, которые способны «расплетаться», имеют более высокие частоты использования всех гидрофильных аминокислотных остатков и Gly, Pro, Cys при сравнении со стабильными альфа-спиралями. Альфа-спирали, которые способны формировать IDPRs, а не петли, обогащены Ala и Met и имеют достоверно более низкие частоты использования Gly, Pro, Thr, Asn, His и Arg в сравнении со стабильными альфа-спиралями.

Альфа-спирали, которые способны к переходу в IDPRs, обогащены Ala, Met, Ile, Val, Tyr, Asp, Glu, Gln и Lys в сравнении с альфа-спиралями, которые способны к переходу в петли. Наиболее выраженные отличия обнаружены для Ala ($12,41 \pm 0,12\%$ и $9,55 \pm 0,0074\%$), Asp ($6,57 \pm 0,090\%$ и $5,10 \pm 0,0056\%$), Glu ($11,31 \pm 0,12\%$ и $9,04 \pm 0,0072\%$), Gln ($6,57 \pm 0,090\%$ и $5,40 \pm 0,0057\%$) и Lys ($9,12 \pm 0,11\%$ и $8,23 \pm 0,0069\%$).

Бета-тяжи, которые способны к структурному переходу в петли, обогащены всеми гидрофильными аминокислотными остатками и тремя гидрофобными – Gly, Pro и Cys. Бета-тяжи, которые способны формировать IDPRs, имеют более высокие частоты использования Ala ($8,70 \pm 0,41\%$), Met ($2,90 \pm 0,24\%$), Tyr ($7,25 \pm 0,38\%$), Asp ($5,80 \pm 0,34\%$), His ($4,35 \pm 0,30\%$) и Lys ($8,70 \pm 0,41\%$) в сравнении со стабильными бета-тяжами (Ala: $5,79 \pm 0,00084\%$; Met: $2,27 \pm 0,00054\%$; Tyr: $5,00 \pm 0,00078\%$; Asp: $2,99 \pm 0,00061\%$; His: $2,44 \pm 0,00056\%$; Lys: $4,81 \pm 0,00077\%$) и бета-тяжами, которые способны к структурному переходу в петли (Ala: $4,27 \pm 0,0071\%$; Met: $1,98 \pm 0,0049\%$; Tyr: $4,06 \pm 0,0070\%$; Asp: $4,55 \pm 0,0074\%$; His: $3,14 \pm 0,0062\%$; Lys: $6,42 \pm 0,0087\%$).

Между IDPRs и стабильными петлями обнаружен ряд достоверных различий в аминокислотном составе. IDPRs обогащены Ser и Glu, а стабильные петли – Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Cys и His. Наиболее выраженные отличия обнаружены для Leu, которого достоверно больше в стабильных петлях ($6,85 \pm 0,00043\%$ и $5,08 \pm 0,017\%$), для Glu ($8,49 \pm 0,022\%$ и $5,62 \pm 0,00039\%$) и Ser ($9,68 \pm 0,024\%$ и $7,52 \pm 0,00045\%$), которых достоверно больше в IDPRs.

Впервые показаны различия стабильных N- и C-концов альфа-спиралей и бета-тяжей от N- и C-концов, склонных к укорочению. N-конец альфа-спиралей стабилизируется Pro, частота встречаемости которого достоверно больше на стабильном N-конце в сравнении с нестабильным ($12,68 \pm 0,54\%$ и $4,62 \pm 1,36\%$, $p < 0,05$). Альфа-спиральную конформацию на C-конце поддерживают Asp, Val и Tyr, частоты встречаемости которых достоверно

выше на стабильном С-конце в сравнении с нестабильными: $4,06 \pm 0,37\%$ и $2,44 \pm 0,53\%$, $p < 0,05$; $4,83 \pm 0,40\%$ и $3,14 \pm 0,60\%$, $p < 0,05$; $4,44 \pm 0,38\%$ и $2,21 \pm 0,50\%$, $p < 0,05$. Дестабилизируется N-конец альфа-спиралей остатком Asp: частоты его встречаемости на нестабильном и стабильном N-конце равны $8,40 \pm 1,80\%$ и $4,63 \pm 0,34\%$, соответственно. С-конец дестабилизируется Ser и Arg: частоты их встречаемости на нестабильном и стабильном С-конце равны $8,49 \pm 0,95\%$, $7,91 \pm 0,92\%$ и $6,01 \pm 0,44\%$, $5,00 \pm 0,41\%$, соответственно. N- и С-концы бета-тяжей стабилизируются исключительно гидрофобными аминокислотными остатками, при этом Val лучше всего стабилизирует N-конец, а Pe – С-конец. Действительно, частоты их встречаемости в сравнении с нестабильными N- и С-концами равны $13,02 \pm 0,50\%$ и $8,37 \pm 1,30\%$; $8,16 \pm 0,41\%$ и $5,62 \pm 1,00\%$, соответственно. Дестабилизируют же N-конец бета-тяжей Asp ($3,74 \pm 0,89\%$ и $1,90 \pm 0,20\%$) и Glu ($8,59 \pm 1,32\%$ и $4,73 \pm 0,31\%$), а С-конец – Gly ($6,93 \pm 1,10\%$ и $4,08 \pm 0,30\%$).

Принцип работы алгоритма PentUnFOLD, сравнение с аналогами, отличительные черты

Разработанный алгоритм PentUnFOLD включает 46 оригинальных вероятностных шкал для определения возможности переходов одних элементов вторичной структуры белка в другие и может работать в трёх режимах. При работе исключительно с аминокислотной последовательностью белка алгоритм вначале предсказывает вторичную структуру, а затем оценивает стабильность её элементов. Во втором режиме работы алгоритм использует данные о вторичной структуре белка и определяет склонность к структурным переходам элементов вторичной структуры в известных границах. В третьем режиме алгоритм дополнительно оценивает вклад внутрибелковых взаимодействий в стабильность структуры белка, так как показано, что одни и те же аминокислотные остатки могут находиться в различных элементах вторичной структуры и, как это ни парадоксально, характер вторичной структуры часто зависит от третичной структуры белка.

Вероятностный алгоритм PentUnFOLD в отличие от всех имеющихся на сегодняшний день аналогов проверяет способность альфа-спиралей и бета-тяжей к переходу в петли, проверяет способность альфа-спиралей, бета-тяжей и петель к переходу во внутренне неупорядоченное состояние, проверяет способность петель формировать альфа-спирали и бета-тяжи, учитывает количество отдалённых взаимодействий со стабильными и нестабильными фрагментами белка, позволяет оценивать влияние аминокислотных замен на стабильность белка до и после совершения им структурного перехода.

Чувствительность и специфичность всех тестируемых алгоритмов находится на низком уровне, за исключением чувствительности алгоритма PentUnFOLD в режиме работы 3D (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристики алгоритма PentUnFOLD и его аналогов, полученные при обработке тестового набора белков

Алгоритм	Показатели эффективности			
	Чувствительность, %	Специфичность, %	Точность	F ₁
DEPICTER	3,59	9,22	0,890	0,052
Foldindex	43,60	9,69	0,612	0,159
GlobPlot	7,24	4,25	0,785	0,054
PONDR VLXT	22,05	9,38	0,756	0,132
PONDR VSL2	23,91	10,01	0,756	0,141
fIDPnn	7,30	14,79	0,887	0,098
AUCpreD	8,59	27,77	0,905	0,131
DISOPRED3	3,09	26,57	0,912	0,055
PentUnFOLD 1D	12,22	14,14	0,853	0,131
PentUnFOLD 2D	39,25	7,99	0,570	0,133
PentUnFOLD 3D	71,44	9,05	0,374	0,161

Данная версия алгоритма характеризуется и самым большим коэффициентом F₁. Алгоритм PentUnFOLD в режиме работы 2D также имеет относительно высокое значение чувствительности. Низкая специфичность и точность обусловлены тем, что алгоритм PentUnFOLD перепредсказывает фрагменты белков, склонные к структурным переходам, как и большинство других алгоритмов, поэтому лучше учитывать сочетание результатов алгоритма PentUnFOLD в режиме 2D или 3D и режима 1D, для которого характерно более высокое значение точности.

Низкие значения специфичности и коэффициента F₁ можно объяснить тем, что все рассчитанные показатели в таблице 1 получены в результате анализа лишь нескольких (от 2 до 5) структур одного и того же белка. Реальные же границы структурной нестабильности белка можно определить лишь путём сравнения друг с другом нескольких десятков его структур без аминокислотных замен. На примере сывороточного альбумина человека мы определили реальные масштабы структурной нестабильности путём анализа 103 его структур и рассчитали показатели из таблицы 1 для всех сравниваемых алгоритмов. Как и ожидалось, значение специфичности выросло в разы, однако для большинства алгоритмов, как ни парадоксально, значительно снизилась чувствительность. Наибольшее значение коэффициента F₁, который традиционно используется для сравнения алгоритмов [Nessi M., Piovesan D., 2021], характерно для алгоритма PentUnFOLD 3D (таблица 2).

Используя алгоритм PentUnFOLD, нами был предложен уникальный пептид SK30 для иммунопрофилактики парвовирусной инфекции, имеющий следующую аминокислотную последовательность: NH₂-SAVDSAARINDFRYSQGWTVADEELLKNIK-COOH. Согласно алгоритмам PentUnFOLD 2D и 3D первая альфа-спираль этого пептида содержит

стабильный фрагмент DSAAR, который стабилизирует альфа-спиральную конформацию фрагмента EELLK С-конца пептида, определённого как стабильный алгоритмом PentUnFOLD 1D.

Таблица 2 – Характеристики алгоритма PentUnFOLD и его аналогов, полученные при обработке 103 3D структур сывороточного альбумина человека

Алгоритм	Показатели эффективности			
	Чувствительность, %	Специфичность, %	Точность	F ₁
DEPICTER	0,29	100,00	0,411	0,006
Foldindex	47,95	65,60	0,544	0,554
GlobPlot	2,05	46,67	0,408	0,039
PONDR VLXT	11,40	55,71	0,423	0,189
PONDR VSL2	38,30	70,43	0,541	0,496
fIDPnn	0,88	75,00	0,413	0,017
DISOPRED3	1,46	35,71	0,402	0,028
PentUnFOLD 1D	7,02	53,33	0,415	0,124
PentUnFOLD 2D	48,83	58,19	0,491	0,531
PentUnFOLD 3D	65,50	60,87	0,547	0,631

С помощью алгоритма PentUnFOLD показано влияние аминокислотных замен, приводящих к развитию прионных заболеваний (болезни Герстманна–Штреусслера–Шейнкера и Крейтцфельда–Якоба) человека, на стабильность структуры большого прионного белка. Алгоритм установил структурные последствия 8 из 10 аминокислотных замен, приводящих к развитию наследственных прионных заболеваний: H187R и F198S увеличивают нестабильность белка, E200K, V203I, D202N, V210I, Q212P и E196K стабилизируют бета-тяжи, которые формируются на месте альфа-спиралей. Также на примере большого прионного белка человека показана роль неупорядоченной части белка (аминокислотные остатки 90–127 на 3D структуре с PDB ID: 2LSB) в поддержании альфа-спиральной конформации его структурированной части (аминокислотные остатки 128–231). Аминокислотные остатки Val122, Leu125, Gly126 и Gly127 из неупорядоченной части способны формировать взаимодействия с гидрофобными бета-тяжами и с гидрофобной стороной второй альфа-спирали, а именно с Tyr162 (второй бета-тяж), Tyr128 и Met129 (первый бета-тяж) и Ile182 (вторая альфа-спираль). В отсутствие же данных взаимодействий на месте пространственно сближенных второй и третьей альфа-спиралей образуются бета-тяжи.

Определение структуры подмембранной части гемагглютинина вируса гриппа А/Н1N1

Установлено, что несмотря на короткую длину (от 10 до 16 аминокислотных остатков в зависимости от подтипа) подмембранная часть

гемагглютини́на имеет общность строения среди всех штаммов вируса гриппа. Данное обстоятельство указывает на то, что подмембранный домен гемагглютини́на вируса гриппа достаточно консервативен, а следовательно, представляет собой хорошую «мишень» для разработки нового подхода к борьбе с гриппом, так как скорость развития устойчивости к новым препаратам за счёт мутаций в этом регионе должна быть очень низкой.

Разработанный алгоритм PentUnFOLD в режиме работы 1D определил возможность структурного перехода петли в бета-тяжи по аминокислотной последовательности подмембранной части гемагглютини́на. На её трёхмерной модели, полученной с помощью SWISS MODEL, алгоритмы PentUnFOLD 2D и 3D определили второй бета-тяж как нестабильный.

На спектрах КД пептида FI15-АСМ при рН=7,4 имеется отрицательный пик на 198 нм и «отрицательное плечо» в районе 220 нм, а при рН=5,0 зарегистрирован только один отрицательный широкий пик в районе 220 нм (рисунок 1 А, Б). Такие различия спектров КД объясняются структурным переходом петли в бета-тяжи. Действительно, по результатам работы сервера BeStSel [Micsonai A. et al., 2018], при рН=7,4 около 29% аминокислотных остатков входят в состав бета-тяжей, а при рН=5,0 – 47%. При снятии спектров КД пептида WI14 зарегистрирован положительный пик при 190 нм и отрицательные пики на 203 и 220 нм. Форма спектра не изменялась при нагревании, что говорит о стабильности вторичной структуры пептида WI14 при повышении температуры при рН=7,4. Наличие положительного пика на 190 нм и отрицательного пика на 220 нм говорит о присутствии бета-структуры. Согласно BeStSel, 4 аминокислотных остатка пептида WI14 входят в состав бета-структуры, а остальные 10 аминокислотных остатков формируют петлю, о чём свидетельствует положение минимума на спектре КД на 203 нм (рисунок 1 В).

По мере закисления среды в эндолизосоме гемагглютинин претерпевает существенную структурную перестройку, в результате чего формируется пора в мембранах вируса и эндолизосомы [Wu N. C., Wilson I. A., 2020]. Характер структурной перестройки хорошо описан для надмембранной части этого белка. Для подмембранной части данный процесс не описан, однако, судя по данным КД, подмембранная часть гемагглютини́на также изменяет свою структуру при рН=5,0. На спектрах КД пептид WI14 при температуре от 5 до 45°C имеет минимумы при 194 нм и при 215 нм (рисунок 1 Г). При температуре 50°C и выше остаётся только один минимум при 217 нм. Минимум в районе 210–220 нм характерен для бета-структурных белков [Sreerama N., Woody R. W., 2003]. Суммарное количество аминокислотных остатков пептида WI14, которые в кислой среде при низкой и при высокой температуре входят в состав бета-структуры, составляет 41% и 40% соответственно.

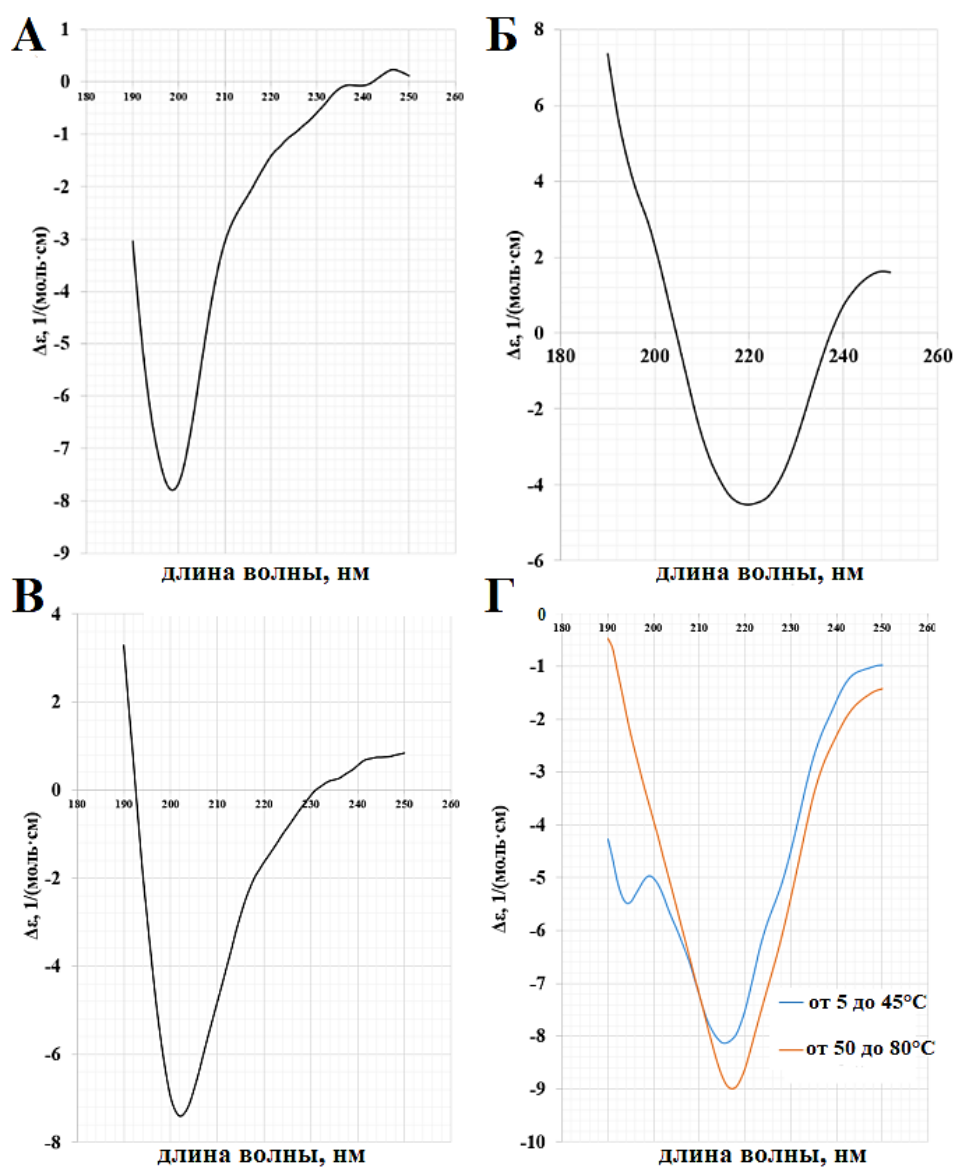


Рисунок 1 – Спектры КД пептида FI15-АСМ при рН=7,4 (А) и при рН=5,0 (Б) и спектры КД пептида WI14 при рН=7,4 (В) и при рН=5,0 (Г)

Формирование бета-структуры пептидом WI14, а также наличие структурного перехода при закислении среды подтверждено и с помощью ИК НПВО. При рН=7,4 полоса амид I пептида WI14 представлена тремя максимумами: пик на 1641 см^{-1} , на 1670 см^{-1} и на 1689 см^{-1} (рисунок 2 А). Положение данных пиков сохранялось во всех шести спектрах, записанных по мере испарения воды из образца. При рН=5,0 полоса амид I пептида сдвинулись влево, и максимумы обнаружены на 1632 см^{-1} , на 1662 см^{-1} и на 1691 см^{-1} соответственно (рисунок 2 Б).

Действительно, для бета-структурных белков и пептидов полоса амид I имеет два компонента: основной, более интенсивный, на $1623\text{--}1641\text{ см}^{-1}$ и дополнительный, менее интенсивный, на $1674\text{--}1695\text{ см}^{-1}$, а пики на 1670 см^{-1} (при рН=7,4) и на 1662 см^{-1} (при рН=5,0) характерны для поворотов [Barth A., 2007].

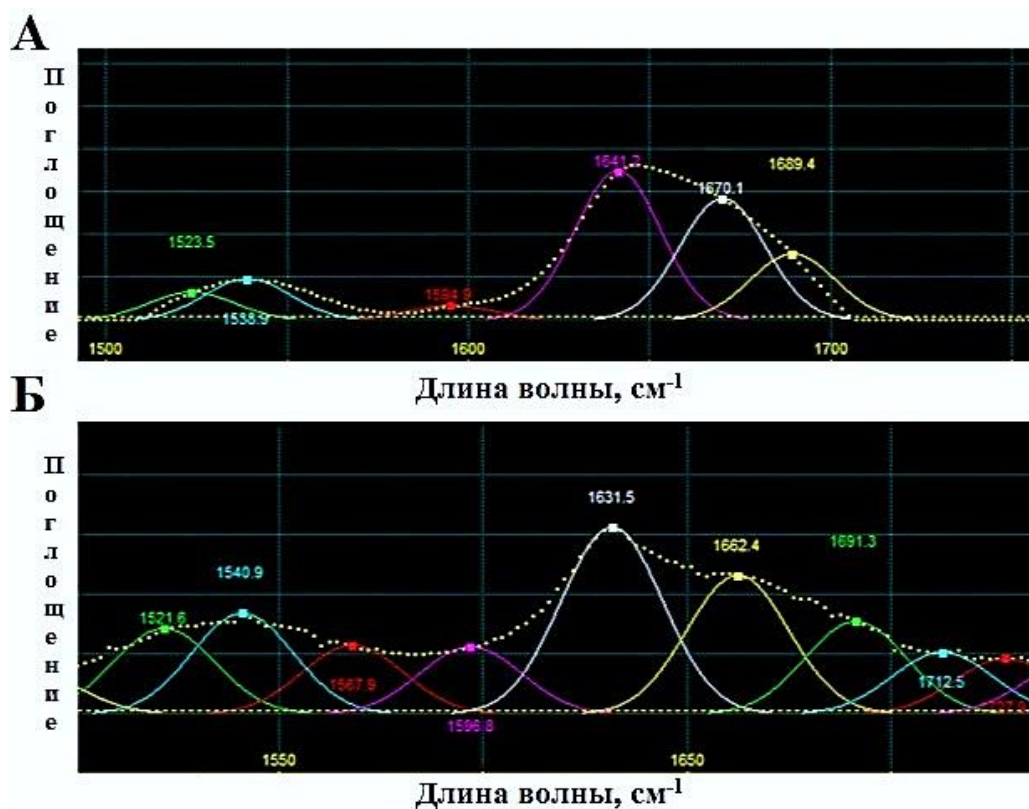
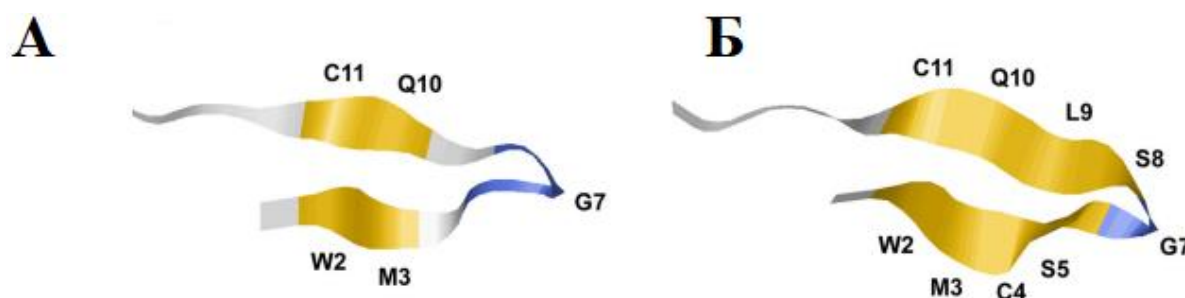


Рисунок 2 – Спектры ИК НПВО пептида WI14 в 0,01 М фосфатном буфере при pH=7,4 (А) и при pH=5,0 (Б)

Таким образом, на основании данных КД и ИК НПВО спектроскопии при помощи молекулярного моделирования впервые в мире установлено строение пептидов, соответствующих подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1 при pH=7,4 и при pH=5,0. Показано, что при закислении среды, происходящим во время жизненного цикла вируса, осуществляется структурный переход петли в бета-тяжи. Согласно результатам молекулярного моделирования подмембранный домен гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1 при pH=7,4 состоит из бета-тяжей Trp2-Met3 и Gln10-Cys11, а при pH=5,0 из более длинных бета-тяжей: Trp2-Ser5 и Ser8-Cys11 (рисунок 3).



Жёлтым цветом обозначены бета-тяжи, синим – Gly7, благодаря которому происходит поворот полипептидной цепи

Рисунок 3 – Структура пептида FI15, соответствующего подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1 при pH=7,4 (А) и при pH=5,0 (Б)

На основании данных голубого нативного электрофореза установлено, что пептиды WI14-АСМ и FI15-АСМ формируют в растворе два типа олигомеров. Молярная масса основного олигомера, характерного для всех пептидов, не превышает 12 кДа, что доказывает, что все пептиды, соответствующие подмембранному домену гемагглютинина вируса гриппа А/Н1N1, формируют олигомеры, порядок которых не выше гексамеров. Эксперимент с Конго красным не выявил наличие бета-амилоида в насыщенных растворах пептидов WI14, WI14-АСМ, FI15, FI15-АСМ как при рН=7,4, так и при рН=5,0.

Пептид FI15, соответствующий подмембранной части гемагглютинина вируса гриппа А/Н1N1, является третьим в мировой практике примером белка, имеющего максимум триптофановой флуоресценции при 308 нм после её возбуждения при 270–295 и 220–230 нм, причём во фракции с молекулярной массой ниже 10 кДа, что возможно только при условии формирования пептидом антипараллельной внутримолекулярной бета-структуры.

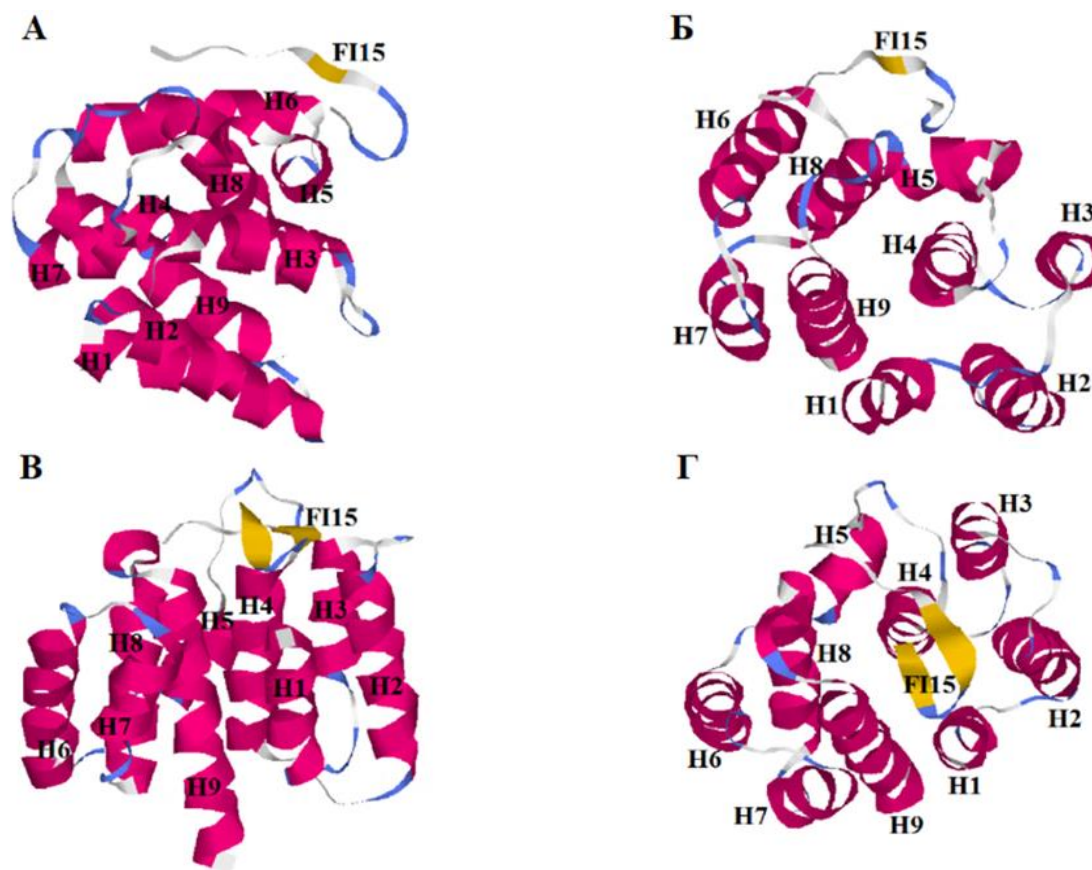
Отбор трипептидов, способных связываться с подмембранным доменом гемагглютинина вируса гриппа А/Н1N1

Известно, что положительно заряженные аминокислотные остатки белка М1 (Arg76 из петли 4; Arg77, Arg78 из альфа-спирали Н5; Arg101, Lys104 из альфа-спирали Н6 и Arg134 из альфа-спирали Н8) формируют электростатические взаимодействия с фосфатидилсеринем внутреннего слоя мембраны, а Gln75 и Gln81 взаимодействуют с фосфатидилхолином мембраны [Höfer C. T. et al., 2019]. Все вышеперечисленные аминокислотные остатки находятся на боковой поверхности матричного белка М1. То есть при рН=7,4 матричный белок М1 повернут к мембране вириона боковой поверхностью и должен взаимодействовать с подмембранным доменом гемагглютинина вируса. При закислении среды структура данного комплекса должна нарушаться с формированием трансмембранной поры, через которую генетический материал вируса попадает в цитоплазму клетки.

В результате проведенного докинга показано, что наиболее энергетически выгодная позиция модели пептида FI15 при рН=7,4 соответствует комплексу, в котором пептид FI15 взаимодействует с альфа-спиралями Н5, Н6 и Н8, формирующими именно ту боковую поверхность белка М1, которой данный белок при рН=7,4 взаимодействует с мембраной вириона (рисунок 4 А, Б).

Энергия взаимодействия двух белков при рН=7,4 равна –504,6 кДж/моль. Формированию такого комплекса пептида FI15 и белка М1 способствует наличие в составе пептида FI15 положительно заряженного остатка Arg12. При рН=5,0 структура комплекса N-концевого домена матричного белка М1 и пептида FI15, соответствующего подмембранной части гемагглютинина, значительно изменяется: модель пептида FI15 взаимодействует с «лицом»

N-концевого домена белка M1, образуемым альфа-спиралями H1, H2, H4, H9, а также петлями, соединяющими данные альфа-спирали (рисунок 4 В, Г).



Альфа-спирали матричного белка M1 обозначены номерами H1–H9 от N- до C-конца
Рисунок 4 – Комплекс модели пептида FI15 и N-концевого домена матричного белка M1 при pH=7,4 (А, Б) и при pH=5,0 (В, Г)

Энергия взаимодействия N-концевого домена матричного белка M1 и модели пептида FI15 при pH=5,0 равна $-403,01$ кДж/моль. С помощью молекулярного моделирования и молекулярного докинга предложены потенциальные трипептиды-блокаторы сборки и разборки капсида вириона гриппа, имеющие наиболее высокое сродство к подмембранной части гемагглютинина вируса гриппа A/H1N1 при pH=7,4 и при pH=5,0. При pH=7,4 наиболее перспективным кандидатом является формилированный трипептид NQD (энергия связывания $-215,31$ кДж/моль), а при pH=5,0 – формилированный трипептид NTD (энергия связывания $-227,78$ кДж/моль).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработан универсальный метод определения фрагментов белков, склонных к структурным переходам, который заключается в сравнении границ элементов вторичной структуры одного и того же белка на разных 3D

структурах, полученных экспериментальным путём. Альфа-спиральные и бета-структурные фрагменты полипептидных цепей, способные к переходу во внутренне неупорядоченное состояние, имеют высокие частоты встречаемости Ala, Met, Asp и Lys в сравнении со стабильными альфа-спиралями и бета-тяжами. В альфа-спиралях и бета-тяжах, склонных к переходу в петли, по сравнению со стабильными альфа-спиралями и бета-тяжами, выше частоты встречаемости всех гидрофильных аминокислотных остатков – Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln, His, Arg, Lys, и трёх гидрофобных – Gly, Cys и Pro. Стабильные петли в сравнении с внутренне неупорядоченными фрагментами обогащены Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Cys, His, а внутренне неупорядоченные фрагменты – Ser и Glu. Каждая четвёртая одиночная альфа-спираль так же, как и каждая четвёртая пара бета-тяжей состоит из нехарактерных для данных типов элементов вторичной структуры аминокислотных остатков или их комбинаций [2–5; 9; 12; 15–17; 23; 26; 27; 29].

2. Оригинальный вероятностный алгоритм PentUnFOLD является первым алгоритмом в мире, который способен к определению фрагментов белков, склонных как к переходу в другие типы элементов вторичной структуры, так и во внутренне неупорядоченное состояние. Алгоритм способен дифференцировать петли и внутренне неупорядоченные фрагменты белка, в отличие от аналогов также способен учитывать взаимодействия между аминокислотными остатками, находящимися в стабильных и нестабильных элементах вторичной структуры белка, определять влияние аминокислотных замен на стабильность белка как в нативном состоянии, так и после совершения структурного перехода. С его помощью осуществлён дизайн пептида SK30 для дальнейшей разработки вакцины от парвовирусной инфекции, предсказано строение подмембранного домена гемагглютинина вируса гриппа A/H1N1, показана роль дальних взаимодействий между аминокислотными остатками неупорядоченной N-концевой половины и упорядоченной C-концевой половины в поддержании альфа-спиральной конформации большого прионного белка человека [1; 6; 9; 11; 13; 18–21; 31].

3. Впервые в мире в эксперименте установлено строение подмембранного домена гемагглютинина вируса гриппа A/H1N1. Данный домен гемагглютинина образует бета-структуру длиной от 4 до 8 аминокислотных остатков с гидрофильной петлёй посередине. Пептиды W114 и F115, соответствующие подмембранному домену гемагглютинина вируса гриппа A/H1N1, в водном растворе при pH=7,4 образуют олигомеры от 3 до 6 порядка, формируя бета-структуру как при pH=7,4, так и при pH=5,0, в восстановленном и в окисленном состоянии. В олигомерах пептида F115 некоторые остатки триптофана находятся в полностью гидрофобном микроокружении, что подтверждается наличием максимума флуоресценции

при 308 нм после возбуждения при 270–295 и 220–230 нм, и также свидетельствует о формировании бета-шпильки [7; 8; 10; 14; 24; 25; 28; 30; 32].

4. Матриксный белок M1 вируса гриппа A/H1N1 образует два разных типа комплексов с пептидом FI15, соответствующим подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа, при pH=7,4 и при pH=5,0. Нарушить процессы сборки и разборки вириона за счёт образования комплекса с подмембранным доменом гемагглютинаина способны формилированные трипептиды NQD и NTD, обладающие наименьшей величиной энергии связывания с ним [10; 22].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Алгоритм PentUnFOLD, доступный в форме сервера (<http://pent-unfold.bsmu.by>), рекомендован для разработчиков синтетических вакцин и специалистов в области белок-белковых и лиганд-рецепторных взаимодействий. Сервер работает как с аминокислотной последовательностью белка, так и с его 3D структурой, учитывая количество взаимодействий между аминокислотными остатками, находящимися в стабильных и нестабильных элементах вторичной структуры.

2. Пептиды WI14, FI15, WI14-АСМ и FI15-АСМ предложены в качестве моделей подмембранного домена гемагглютинаина вируса гриппа A/H1N1 в экспериментах *in vitro*, а их 3D модели, созданные на основании полученных экспериментальных данных, в *in silico* дизайне новых противовирусных препаратов.

3. Пептид SK30, соответствующий фрагментам минорного капсидного белка парвовируса В19, наименее склонным к структурным переходам, рекомендован к дальнейшей разработке вакцины от парвовирусной инфекции.

Знания о строении синтетического пептида WI14-АСМ (акт внедрения от 25.02.2020 № 35–20/203–03) и информация о формилированном пептиде NQ(OH)D, проявляющим высокую степень сродства к подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа A/H1N1 (акт внедрения от 25.02.2020 № 36–20/203–03), используются в научном процессе НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозёрского МГУ имени М. В. Ломоносова. Данные о флуоресценции синтетического пептида FI15 при pH=5,0 и при pH=7,4 (акт внедрения от 06.02.2020) используются в учебном процессе кафедры медицинской и биологической физики УО «БГМУ». Алгоритм PentUnFOLD (акт внедрения от 16.05.2023 № 2.4/114) используется в образовательном процессе кафедры высокомолекулярных соединений БГУ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, соответствующих п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий

1. The part of a long beta hairpin from the scrapie form of the human prion protein is reconstructed in the synthetic CC36 protein / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, K. Szpotkowski, **V. V. Poboinev**, K. Y. Kakhanouskaya // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 84. – P. 1462–1479.

2. **Побойнев, В. В.** Особенности аминокислотного состава альфа-спиральных участков в полипептидных цепях белков различных структурных классов / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. – 2017. – № 4. – С. 58–66.

3. Стабильность альфа-спиральных и бета-структурных блоков в белках четырех структурных классов / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва, А. Н. Стожаров // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 391–400.

4. Структурные переходы в смешанных классах белков / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва, А. Н. Стожаров // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 326–337.

5. Mutational pressure and natural selection in epidermal growth factor receptor gene during germline and somatic mutagenesis in cancer cells / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, **V. V. Poboinev**, K. V. Yurchenko // *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2019. – Vol. 815. – P. 1–9.

6. Сайты связывания билирубина сывороточным альбумином человека: возможность влияния на них мутаций, вызванных радиацией / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, А. Н. Стожаров, Т. А. Хрусталёва // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук*. – 2021. – Том 18, № 1. – С. 46–57.

7. Spectra of tryptophan fluorescence are the result of co-existence of certain most abundant stabilized excited state and certain most abundant destabilized excited state / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, **V. V. Poboinev**, A. N. Stojarov, L. V. Kordyukova // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – Vol. 257. – 119784.

8. The cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin is β -structural / V. V. Khrustalev, L. V. Kordyukova, A. M. Arutyunyan,

V. V. Poboinev, T. A. Khrustaleva, A. N. Stojarov, L. A. Baratova // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. – 2022. – Vol. 40. – P. 4642–4661.

9. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins / **V. V. Poboinev**, V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, T. E. Kasko, V. D. Popkov // Amino Acids. – 2022. – Vol. 54. – P. 1155–1171.

10. Peptide models of the cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin expand understanding its pH-dependent modes of interaction with matrix protein M1 / **V. V. Poboinev**, V. V. Khrustalev, A. A. Akunevich, N. V. Shalygo, A. N. Stojarov, T. A. Khrustaleva, L. V. Kordyukova // The Protein Journal. – 2023. – Vol. 42. – P. 288–304.

Статьи в сборниках научных трудов, материалах конференций, журналах

11. **Побойнев, В. В.** О перспективах использования синтетического прионного пептида СС36 в качестве вакцинного антигена против прионных заболеваний / **В. В. Побойнев** // Студенты и молодые учёные Белорусского государственного медицинского университета – медицинской науке и здравоохранению Республики Беларусь : сборник научных трудов студентов и молодых учёных / Белорус. гос. мед. ун-т. ; под ред. А. В. Сикорского, О. К. Дорониной. – Минск, 2017. – С. 198–201.

12. Хрусталёв, В. В. Особенности аминокислотного состава бета-тяжей в белках различных структурных классов / В. В. Хрусталёв, **В. В. Побойнев**, Т. А. Хрусталёва // Фундаментальная наука в современной медицине 2017 : материалы сателл. дистанционной науч.-практ. конф. студентов и молодых учёных / Белорус. гос. мед. ун-т. ; под ред. А. В. Сикорского [и др.]. – Минск, 2017. – С. 331–336.

13. Поиск наиболее структурно устойчивых фрагментов тирозинкиназного домена рецептора эпидермального фактора роста / В. В. Хрусталёв, **В. В. Побойнев**, К. В. Юрченко, Т. А. Хрусталёва // Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм : материалы 1-й белорусско-польско-литовской науч. конф., посвящ. 250-летию академика А. Снядецкого, Гродно, 8–9 ноября 2018 г. / Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений национальной академии наук Беларуси» ; редкол.: И. Н. Семененя [и др.]. – Минск, 2018. – Вып. 2. – С. 154–159.

14. W14 peptide corresponding to the inner domain of H1N1 Influenza hemagglutinin changes its secondary structure in acidic medium / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, **V. V. Poboinev**, A. M. Arutyunyan, A. L. Ksenofontov, L. V. Kordyukova // 9th Moscow conference on computational

molecular biology MCCMB'19 : proceedings of conference, Moscow, 27–30 July 2019 / Lomonosov Moscow State University. – Moscow, 2019. – P. 1–4.

15. **Побойнев, В. В.** Структурная изменчивость альфа-спиральных белков / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Инновационные технологии в фармации : материалы Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. уч., посвящ. 100-летию со дня образования Иркутского государственного медицинского университета, Иркутск, 14–15 июня 2019 г. / Иркутский гос. мед. ун-т. ; под ред. Е. Г. Приваловой. – Иркутск, 2019. – С. 118–127.

16. Биоинформационное проектирование ингибиторов рецепторов эпидермального фактора роста, основанное на теории мутационного давления / В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва, **В. В. Побойнев**, К. В. Юрченко // Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм : материалы 1-й белорусско-польско-литовской науч. конф., посвящ. 250-летию академика А. Снядецкого, Гродно, 8–9 ноября 2018 г. / Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений национальной академии наук Беларуси» ; редкол.: И. Н. Семененя [и др.]. – Минск, 2019. – Вып. 3. – С. 47–51.

17. **Побойнев, В. В.** Стабильность древних белков заключается в их упорядоченной нестабильности / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Биологически активные вещества природного происхождения в регуляции процессов жизнедеятельности : сб. ст. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, 5–6 октября 2021 г. / Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений национальной академии наук Беларуси» ; редкол.: И. Н. Семененя [и др.]. – Гродно, 2021. – С. 392–397.

18. Закономерности в контактах, формируемых структурно неупорядоченным фрагментом большого прионного белка человека / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, О. В. Ачинович, Л. Г. Петрушенко // Физико-химическая биология как основа современной медицины : материалы докл. междунар. науч. конф., Минск, 28 октября 2022 г. / Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол.: В. В. Хрусталёв [и др.]. – Минск, 2022. – С. 236–241.

19. Вторичная структура рецептор-связывающего домена парвовируса В19 / В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва, **В. В. Побойнев**, А. Н. Стожаров, Н. В. Шалыго, Е. О. Самойлович, М. А. Ермолович, Г. В. Семейко // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии ; под ред. В. А. Горбунова [и др.]. – Минск, 2022. – Вып. 14. – С. 150–156.

20. Дизайн синтетического вакцинного пептида, соответствующего фосфолипазному домену капсидного белка парвовируса В19 / В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва, **В. В. Побойнев**, А. Н. Стожаров, Н. В. Шальго, Е. О. Самойлович, М. А. Ермолович, Г. В. Семейко // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии ; под ред. В. А. Горбунова [и др.]. – Минск, 2022. – Вып. 14. – С. 157–163.

21. USSA – метод описания вторичной структуры белков / В. В. Хрусталёв, Т. Е. Касько, **В. В. Побойнев**, Т. А. Хрусталёва // Биохимия и молекулярная биология. – 2022. – Т. 1, № 1. – С. 8–15.

22. **Побойнев, В. В.** Моделирование взаимодействия цитоплазматического домена гемагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1 с матриксным белком М1 / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Биохимия и молекулярная биология. – 2022. – Т. 1, № 1. – С. 67–73.

Тезисы докладов

23. **Побойнев, В. В.** Особенности неструктурированных участков белков разных структурных классов / **В. В. Побойнев**, Т. А. Хрусталёва, В. В. Хрусталёв // Фундаментальные и прикладные науки – медицине : междунар. науч. конф., Минск, 6 октября 2017 г. : тез. докл. / Новости медико-биологических наук. – Минск, 2017. – Т. 16, № 1. – С. 88–89.

24. Общность строения подмембранного участка различных подтипов гемагглютинаина вируса гриппа А / В. В. Хрусталёв, Л. В. Кордюкова, Т. А. Хрусталёва, **В. В. Побойнев** // Фундаментальные и прикладные науки – медицине : междунар. науч. конф., Минск, 12 октября 2018 г. : тез. докл. / Новости медико-биологических наук. – Минск, 2018. – Т. 18, № 3. – С. 115–116.

25. Homology-based modeling of the C-terminal inner region of pandemic H1N1 Influenza virus hemagglutinin / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, L. V. Kordyukova, **V. V. Poboinev** // 6th International Influenza Meeting : book of abstracts, Muenster, Germany, 2–4 September, 2018 / University of Muenster. – Muenster, 2018. – P. 19.

26. Термодинамическая характеристика стабильности структуры белков четырёх классов / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, А. Н. Стожаров, Т. А. Хрусталёва // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф., посвящ. 90-летию Национальной академии наук Беларуси и 45-летию Института биофизики и клеточной инженерии, Минск, 27–29 июня 2018 г. : тез. докл. / Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси ; редкол.: И. Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2018. – С. 34.

27. **Побойнев, В. В.** Структурная изменчивость белков / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Физико-химическая биология как основа современной медицины : респ. конф. с междунар. участием, посвящ. 110-летию со дня рождения В. А. Бандарина, Минск, 24 мая 2019 г. : тез. докл. : в 2 ч. / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2019. – Ч. 2. – С. 67–68.

28. Structural study of Influenza virus hemagglutinin C-terminal region [Electronic resource] / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, A. M. Arutyunyan, E. V. Shtykova, M. V. Petoukhov, N. V. Fedorova, **V. V. Poboinev**, L. V. Kordyukova // From Molecules To Living Systems : 44th FEBS Congress, Poland, Krakow, 6–11 July 2019 / FEBS Congress 2019 App. – Vol. 9, № Suppl. 1. – P. 253.

29. **Побойнев, В. В.** Воспроизведение вторичной структуры белками различных структурных классов после «перемешивания» их аминокислотных последовательностей / **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Физико-химическая биология как основа современной медицины : респ. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию со дня рождения Т. С. Морозкиной, Минск, 29 мая 2020 г. : тез. докл. / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. А. Д. Тагановича, В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2020. – С. 132–134.

30. Дисульфидные связи в пептиде WI14 / Л. В. Кордюкова, **В. В. Побойнев**, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Физико-химическая биология как основа современной медицины : респ. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию со дня рождения Т. С. Морозкиной, Минск, 29 мая 2020 г. : тез. докл. / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. А. Д. Тагановича, В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2020. – С. 77–78.

31. Analysis of helix-to-coil transitions in human serum albumin [Electronic resource] / **V. V. Paboineu**, V. V. Khrustalev, A. N. Stazharau, T. A. Khrustaleva // Molecules of Life: Towards New Horizons: 45th FEBS Congress, Slovenia, Ljubljana, 3–8 July 2021 / FEBS Congress 2021 App. – Vol. 11, № Suppl. 1. – P. 172.

32. Структурная нестабильность подмембранной части гемагглютинина вируса гриппа типа А / **В. В. Побойнев**, Л. В. Кордюкова, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Физико-химическая биология как основа современной медицины : междунар. науч. конф., посвящ. 75-летию со дня рождения профессора Е. В. Барковского, Минск, 21 мая 2021 г. : тез. докл. / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. В. В. Хрусталёва, А. Д. Тагановича, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2021. – С. 212–214.

РЭЗІЮМЭ

Пабойнеў Віктар Вітольдавіч

Выяўленне участкаў бялкоў, схільных да пэўных тыпаў структурных пераходаў

Ключавыя словы: унутрана неўпарадкаваныя бялкі, структурныя пераходы, амінакіслотныя астаткі, спектры кругавога дыхраізму (КД), інфрачырвоныя (ІЧ) спектры парушанага поўнага ўнутранага адлюстравання (ППУА), флуарэсцэнцыя трыптафану, вялікі прыённы бялок чалавека, падмембранная частка гемаглютыніну віруса грыпу, парвавірус В19, матрыксы бялок М1, трыпептыд

Мэта даследавання: распрацоўка і прымяненне метаду выяўлення ўнутрана неўпарадкаваных фрагментаў бялкоў з выкарыстаннем даных аб іх другаснай і трацічнай структуры.

Метады даследавання: біяінфарматычны аналіз, цвердафазны сінтэз пептыдаў, КД-спектраскапія, ІЧ-спектраскапія ППУА, флуарэсцэнтная спектраскапія, блакітны натыўны электрафарэз, малекулярнае мадэляванне, малекулярны докінг.

Атрыманя вынікі і іх навізна. Упершыню вызначаны адрозненні стабільных альфа-спіраляў і бэта-цяжоў ад тых, якія здольныя да структурнага пераходу ў петлі і ў цалкам неўпарадкаваны стан. Даказаны адрозненні амінакіслотнага складу петляў і цалкам неўпарадкаваных фрагментаў бялкоў. Распрацаваны прынцыпова новы алгарытм PentUnFOLD здольны вызначаць розныя віды структурных пераходаў у бялках і ўлічваць не толькі інфармацыю аб межах элементаў другаснай структуры, але і колькасць унутрыбялковых узаемадзеянняў. З дапамогай дадзенага алгарытму прапанаваны ўнікальны пептыд SK30 для імунапрафілактыкі парвавіруснай інфекцыі. Упершыню эксперыментальна выяўлена бэта-структурная будова падмембраннай часткі гемаглютыніну віруса грыпу А/Н1N1. Упершыню атрыманы структуры комплексаў падмембраннай часткі гемаглютыніну і матрыкснага бялку М1 віруса грыпу А/Н1N1 пры рН=5,0 і пры рН=7,4 і прапанаваны трыпептыды для парушэння структуры дадзеных комплексаў.

Рэкамендацыі па вырыстанні: даныя аб структуры падмембраннага дамена гемаглютыніну віруса грыпу А/Н1N1 могуць быць выкарыстаны для распрацоўкі новага падыходу для прафілактыкі і лячэння грыпу.

Галіна прымянення: біяхімія, медыцына, імуналогія, біяфізіка.

РЕЗЮМЕ

Побойнев Виктор Витольдович

Выявление участков белков, склонных к определённым типам структурных переходов

Ключевые слова: внутренне неупорядоченные белки, структурные переходы, аминокислотные остатки, спектры кругового дихроизма (КД), инфракрасные (ИК) спектры нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), флуоресценция триптофана, большой прионный белок человека, подмембранная часть гемагглютинина вируса гриппа, парвовирус В19, матриксный белок М1, трипептид

Цель исследования: разработка и применение метода выявления внутренне неупорядоченных фрагментов белков с использованием данных об их вторичной и третичной структуре.

Методы исследования: биоинформатический анализ, твёрдофазный синтез пептидов, КД-спектроскопия, ИК-спектроскопия НПВО, флуоресцентная спектроскопия, голубой нативный электрофорез, молекулярное моделирование, молекулярный докинг.

Полученные результаты и их новизна. Впервые определены различия стабильных альфа-спиралей и бета-тяжей от тех, которые способны к структурному переходу в петли и в полностью неупорядоченное состояние. Доказаны различия аминокислотного состава петель и полностью неупорядоченных фрагментов белков. Разработанный принципиально новый алгоритм PentUnFOLD способен определять разные виды структурных переходов в белках, учитывая не только информацию о границах элементов вторичной структуры, но и количество внутрибелковых взаимодействий. С помощью данного алгоритма предложен уникальный пептид SK30 для иммунопрофилактики парвовирусной инфекции. Впервые экспериментально доказано бета-структурное строение подмембранной части гемагглютинина вируса гриппа А/Н1N1. Впервые получены структуры комплексов подмембранной части гемагглютинина и матриксного белка М1 вируса гриппа А/Н1N1 при рН=5,0 и при рН=7,4 и предложены трипептиды для нарушения структуры данных комплексов.

Рекомендации по применению: данные о строении подмембранного домена гемагглютинина вируса гриппа А/Н1N1 могут быть использованы для разработки нового подхода для профилактики и лечения гриппа.

Область применения: биохимия, медицина, иммунология, биофизика.

SUMMARY

Poboinev Victor Vitoldovich

Detection of protein regions prone to certain types of structural shifts

Key words: intrinsically disordered proteins, structural shifts, amino acid residues, circular dichroism (CD) spectra, infrared (IR) spectra of attenuated total reflectance (ATR), tryptophan fluorescence, major human prion protein, cytoplasmic tail of influenza virus hemagglutinin, parvovirus B19, matrix protein M1, tripeptide

The aim of the study: development and application of a method for the detection intrinsically disordered protein regions using data on their secondary and tertiary structure.

Research methods: bioinformatic analysis, solid-phase synthesis of peptides, CD spectrometry, IR ATR spectrometry, fluorescent spectroscopy, blue native electrophoresis, molecular modeling, molecular docking.

Obtained results and their novelty. For the first time the differences between stable alpha helices and beta strands from those that are prone to structural shifts into random coil and into intrinsically disordered state have been determined. The differences between random coil and intrinsically disordered protein regions have been proven. Fundamentally new PentUnFOLD algorithm is able to determine different types of structural shifts of proteins, taking into account not only the information about the boundaries of secondary structure elements, but also the number of intraprotein interactions. Using this algorithm, a unique peptide SK30 for immunoprophylaxis of parvovirus infection is proposed. For the first time the structure of the cytoplasmic tail of the influenza A/H1N1 virus hemagglutinin has been experimentally shown. For the first time, the structure of complexes of the cytoplasmic tail of the hemagglutinin and matrix protein M1 of the influenza A/H1N1 virus were obtained at pH=5.0 and at pH=7.4, and tripeptides were proposed to disrupt the structure of these complexes.

Recommendations for usage: data on the cytoplasmic tail of the influenza A/H1N1 virus hemagglutinin can be used to develop a new approach for the prevention and treatment of influenza.

Field of application: biochemistry, medicine, immunology, biophysics.



Подписано в печать 13.10.23. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Хероx office».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 1,63. Уч.-изд. л. 1,73. Тираж 60 экз. Заказ 574.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.