

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Минеева Константина Сергеевича** «Разработка методов ЯМР-спектроскопии и их применение для исследования олигомеризации мембранных белков», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Рецензируемая работа посвящена разработке методов исследования пространственного строения и динамики мембранных белков в различных мембраноподобных средах с использованием спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Мембранные белки являются одними из наиболее сложных объектов для структурных исследований биофизическими методами, такими как спектроскопия ЯМР, рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия. С другой стороны, изучение их структуры и подвижности открывает широкие возможности для анализа на молекулярном уровне их транспортных и сигнальных функций, а также для разработки лекарственных препаратов. Основной проблемой применения метода рентгеноструктурного анализа в их исследовании является трудность кристаллизации данного класса белков, поскольку для их растворимости необходимо наличие гидрофобного и полярного окружения. Для решения этой проблемы применяется метод кристаллизации в кубической фазе, однако даже в этом случае не удается получить кристаллы мембранных белков с одним трансмембранным сегментом, поскольку они содержат подвижные неупорядоченные участки. Это же их свойство приводит к снижению разрешения карт электронной плотности полученных методом криоэлектронной микроскопии. Что касается применения метода спектроскопии ЯМР высокого разрешения в изучении структуры мембранных белков, то здесь основной проблемой является ограничение применения метода для объектов с большой молекулярной массой, поскольку белки находятся в мембраноподобных средах (МПС). Подбор МПС малого размера, адекватно имитирующих клеточную мембрану, а также разработка новых исследований мембранных белков и мембраноподобных сред, несомненно, является актуальной задачей, поскольку позволит получить новую информацию о функционировании мембранных белков. Решению данной проблемы и посвящена данная работа.

Диссертационная работа Минеева К.С. построена по традиционной схеме и состоит из Введения, литературного обзора (Главы 1–2), краткой характеристики объектов исследования (Глава 3), обсуждения результатов

(Главы 4–7), экспериментальной части (Глава 8), Выводов, списка используемых сокращений и списка литературы.

В введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены методы и объекты исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Первые две главы представляют собой литературный обзор, в котором изложены основные положения спектроскопии ЯМР в исследовании структуры мембранных белков и методы измерения свободной энергии взаимодействия мембранных белков. Описаны характеристики мембраноподобных сред на основе органических растворителей, поверхностно-активных веществ, бицелл, липид-белковых нанодисков, липодисков и полимеров. Рассмотрены методы получения белков с обогащенным составом по изотопам  $^2\text{D}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  и дано описание методик ЯМР для исследования больших белков. Описаны методы измерения свободной энергии взаимодействия мембранных белков на основе электрофореза в полиакриламидном геле, ультрацентрифугирования, индуктивно-резонансного переноса энергии, изотермической титрационной калориметрии, и подходов на основе геной инженерии. Автор проанализировал большой массив информации, содержащийся в 388 источниках, и привел подробные иллюстрации, что дает достаточно полное представление о существующих на данный момент методах исследования мембранных белков. Следует выделить очень важный вывод из обобщения литературных данных – «кристаллические структуры не могут рассматриваться в качестве идеального эталона, кристаллизация приводит к возникновению ненативных контактов белок-белок, которые меняют конформацию подвижных и неструктурированных регионов белка – делают их жесткими и даже приводят к образованию регулярной вторичной структуры белка», (стр. 33).

Обзор имеет особую ценность и можно рекомендовать автору диссертации опубликовать его и в отечественном издании, по крайней мере в части описания МПС, например в журнале «Успехи Химии».

В Гл. 3. дана краткая характеристика объектов исследования – мембранных белков I типа (рецепторные тирозинкиназы, толл-подобные рецепторы, рецептор нейтрофинов p75).

Гл. 4. содержит результаты разработки методов анализа свойств мембраноподобных сред и параметров малых изотропных бицелл различного состава. Автором были разработаны методы исследования структуры изотропных бицелл на основе спектроскопии ЯМР, основанные на измерении размера частиц в зависимости от соотношения липид/детергент ( $q$ ), температуры, концентрации свободного детергента, и наблюдении фазовых переходов. С помощью разработанной автором методики наблюдения фазовых

переходов на основе спектроскопии  $^{31}\text{P}$  впервые было показано, что фазовые переходы наблюдаются даже в самых малых изотропных бицеллах. Автор проанализировал для большого количества различных МПС такие параметры как размер частиц и концентрация детергента в мономерной форме, на основе чего возможно рассчитать состав смесей липидов и детергентов, необходимый для проведения структурных исследований мембранных белков. Были изучены параметры бицелл с модельными трансмембранными белками и разработаны методы измерения радиуса частиц с белком на основании кросс-скорелированной релаксации  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .

В Гл. 5. дано описание разработки методов определения структуры димеров мембранных белков на основе изотопной фильтрации, картировании изменений химических сдвигов и параметров подвижности. Применимость данных методов показана на изучении структуры димерных трансмембранных доменов рецепторных тирозин киназ и доменов толл-подобных рецепторов. На основе экспериментальных данных показано, что наиболее оптимальным подходом является гетероядерная фильтрация спектров ядерного эффекта Оверхаузера по  $^{13}\text{C}$  с регистрацией сигналов метильных групп и использование эволюции с постоянным временем задержки импульсов. На основе наблюдаемых изменений химических сдвигов ядер  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  метильных групп автором был предложен подход для наблюдения перехода мономер/димер мембранных белков. На его основе проведено исследование пространственных структур 12 димеров и 2 тримеров мембранных белков. Построена первая модель полноразмерного толл-подобного рецептора в димерном состоянии.

Гл.6. посвящена разработке методов измерения свободной энергии и кинетики взаимодействия мембранных белков в МПС на основе измерения заселенностей олигомерных форм мембранных белков по двумерным гетероядерным спектрам ЯМР, а также модели равновесия между олигомерными формами, учитывающей мицеллярную среду используемых мембраноподобных сред. С помощью данных методов было изучено поведение односпиральных мембранных доменов рецептора VEGFR2 и белка HER4. Показано, что стабильность димера трансмембранного домена зависит от изменения в составе липидного окружения.

В Гл. 7. описаны методы исследования структуры крупных фрагментов клеточных рецепторов EGFR, HER2 и p75. Для EGFR было показано, что структура примембранного региона зависит от типа МПС. Для рецептора HER2 была определена пространственная структура димера конструктора в мицеллах детергента. С использованием хелатного комплекса парамагнитных ионов  $\text{Gd}^{3+}$  в качестве релаксанта было выявлено, что трансмембранный домен и цитоплазматические примембранные регионы экранированы от растворителя, в

то время как петля между доменами экспонирована в водное окружение, что дополнительно подтверждается контактами ЯЭО белок-детергент. На основе анализа экспериментально полученных структур трансмембранного домена и трансмембранного домена с цитоплазматическим примембранным регионом показано, что наличие цитоплазматического примембранного региона влияет на структуру димера трансмембранного домена, то есть состояния данных частей молекулы взаимосвязаны. Таким образом, было показано, что включение даже небольших молекулярных фрагментов таких, как примембранные регионы, к трансмембранному домену белков позволяет получить важную дополнительную информацию о поведении мембранного белка с одним трансмембранным сегментом.

К работе нет замечаний принципиального характера, которые повлияли бы на общую высокую оценку уровня проведенных исследований и достоверности полученных результатов. Тем не менее, есть ряд замечаний, которые в значительной мере отражались на восприятии весьма сложного многокомпонентного материала диссертации.

#### Замечания общего характера.

1. Представляется нецелесообразным выделение отдельной Главы 3 как по объему и содержанию, так и по форме (глава должна содержать как минимум два раздела). Материал вполне можно было включить в Гл. 8.
2. Текст диссертации избыточно перегружен жаргонными выражениями и англицизмами, что привело к пунктуационным опискам – ошибкам. (Детекция (стр. 7 и далее, за редким случаем используется общепринятый термин детектирование; конформационные пертурбации (стр. 77), пертурбация химсдвигов (стр. 195), неподелённый электрон (стр.73), «оптимальными ядрами для детекции являются метильные группы (возможно, автор имел ввиду ядра  $^1\text{H}$  или  $^{13}\text{C}$  метильных групп?); «для восстановления заселенности сигнала из..., стр. 222» и т.п.
3. Имеют место терминологические небрежности и неточности:
  - гиромагнитное отношение не зависит от внешнего магнитного поля, а является внутренней характеристикой магнитных ядер (стр. 42);
  - чувствительность  $^{19}\text{F}$  ЯМР несколько уступает по чувствительности  $^1\text{H}$  ЯМР; фтористые соединения широко распространены в природе, токсическое воздействие на окружающую среду хорошо известно, более того, применение  $^{19}\text{F}$  ЯМР относят и к области наук о жизни;
  - термин «тотальное мечение» использован неудачно – в данном контексте более применим термин «изотопное обогащение» или «изотопное

замещение» с целью увеличения макроскопической намагниченности ядер, стр. 41 и далее;

- слово «частицы» не всегда используется корректно. В ряде случаев предпочтительней было бы использовать термин «агрегаты», «комплексы» (например, стр.6). (Как нужно понимать фразы: «обмен веществом между частицами», стр. 21; «...когда в растворе начинают образовываться частицы», стр. 25, «ЯМР в частицах МПС», стр. 30, «МПС с частицами малого размера», стр. 31, обмен материей между частицами», стр.131 и т.п.);
- практически повсеместно употребляется термин «релаксация» без указания к чему это относится, нечетко используются его измеряемые параметры: время релаксации и скорость релаксации; при обсуждении влияния движения на времена релаксации следовало бы оперировать общепринятыми понятиями – времена корреляции молекулярного движения  $\tau_c$  и ларморовая частота прецессии  $\omega_0$ , точнее величиной  $\tau_c\omega_0$ , это относится, прежде всего, к утверждению «из-за замедленной вращательной диффузии замедляется продольная и ускоряется поперечная релаксация протонов и других ЯМР-активных (*магнитных?*) ядер, стр.35); как понимать: «система релаксирует за  $N$  раз», стр.64; далее «...импульсных последовательностей, осторожно обращающихся с намагниченностью растворителя... Gd влияет на релаксацию растворителя, практически не влияет на поперечную релаксацию белка», стр.65; странно выглядит фраза «параметры быстрых движений в нс и пс – диапазонах», стр.58, «чрезвычайно подвижен в нс и пс диапазонах скоростей», стр. 25, «медленное движение домена смерти в мкс – мс диапазоне», стр. 267.

4. Объекты исследования относятся к наиболее сложным для исследования молекулярным системам из-за наличия мезофазы (ЖК фазы) разной природы. И было бы полезно дать общее определение типов фаз фазовых переходов и их основных характеристик в терминах фазовых диаграмм.

Замечания содержательного плана:

Глава 4.

- температура измерений « $-20\text{ }^\circ\text{C}$ » приведена ошибочно», стр.114, (это описка, автор имел в виду « $+20\text{ }^\circ\text{C}$ »);
- диссертация не содержит иллюстрации, которая позволяет утверждать, что «параметр  $\lambda$  коррелирует с массой молекулы детергента с коэффициентом близким к 1», стр. 115 и 116, соответственно);
- что такое «температурный коэффициент млрд.д./K»?;

- фраза «холестерин является одним из важнейших компонентов клеточных мембран животных» относится и к человеку;
- какой вид трансляционной диффузии молекул липидов имеет в виду автор? (стр. 121);

#### Глава 6:

- в формуле 31 допущена описка (стр.231): вероятно, правильно:  

$$2\pi \left( (R-r)^2 - S_{prot} \right) / S_0;$$
- для энергии активации димеризации получена, как справедливо отмечает автор, «чрезвычайно большая» величина 28 ккал/моль (здесь и далее не «ккал/М»), (рис. 85А и текст на стр. 235), при этом получена она в рамках эмпирического уравнения Аррениуса. Оценка константы скорости обмена при комнатной температуре была произведена по величине обменного вклада в ширину линии и ей должна соответствовать величина свободной энергии активации порядка 18–20 ккал/моль в рамках теории абсолютных скоростей первого (псевдопервого) порядка. При использовании уравнения Эйринга и Вин – Джонса, вероятнее всего, была бы получена примерно такая же величина (т.е. 28 ккал/моль) энтальпии активации, но аномально большая величина энтропии активации, порядка 120 э.е. (Дж/моль<sup>-1</sup>·К<sup>-1</sup>) что, в свою очередь, указывало бы энтропийную природу перехода через барьер как на более вероятную. Фраза «Был проведен анализ формы линий... и далее... . Ниже 15°С медленная вращательная диффузия препятствует анализу спектров ЯМР, а выше 40°С переходит из медленного в промежуточный, что проявляется и ...» нуждается в пояснении, поскольку смешиваются процессы разной природы и в разных временных шкалах ЯМР. Для времени корреляции вращательной диффузии следовало использовать общепринятое обозначение  $\tau_c$ , рис. 91В,С.

Глава 7. Фраза «...при рН раствора выше (5.8) и ниже (3.5) рКа сформулирована нечетко, стр. 254.

Большая часть отмеченных замечаний типична для соискателей квалификационных работ, публикующих свои результаты в силу необходимости в зарубежных журналах. Это следствие отсутствия опыта изложения материала на русском языке и общения с русскоязычной редакцией. В заслугу диссертанта следует отнести четкое разделение результатов с основными соавторами публикаций, оценку стоимости экспериментов.



Применительно к данной области исследования, проставленные диссертантом акценты на методический и методологический аспекты представленной работы, считаю, совершенно оправданными. В тоже время, следует отметить, что полученные результаты исследований самоценны.

Высказанные замечания не затрагивают основных положений, защищаемых автором, и выводов диссертации и не снижают ценности проведенного исследования и высокого качества представленной диссертационной работы. Диссертация производит впечатление законченного исследования, основанного на объемной и тщательно выполненной экспериментальной работе. Ее результаты могут быть использованы в организациях, занимающихся структурными исследованиями биомолекул, например, в Институте Белка РАН (Пушино), в МГУ, СПбГУ, КФУ, НГУ, в ряде институтов СО РАН, ПИЯФ им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт» и других научных центрах. Основные результаты опубликованы в 23 рецензируемых научных журналах и апробированы на научных конференциях различного уровня. Содержание работы в полной мере отражено в автореферате.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Минеева Константина Сергеевича «Разработка методов ЯМР-спектроскопии и их применение для исследования олигомеризации мембранных белков» соответствует требованиям (в том числе, п.9), предъявляемым к докторским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

д.х.н., профессор, заведующий кафедрой  
медицинской физики Института физики,  
руководитель Международного центра  
магнитного резонанса Казанского  
(Приволжского) федерального  
университета.

420008, Казань, ул. Кремлевская 18, КФУ

Тел. (843)2337456

E-mail: Albert.Aganov@kpfu.ru

«13» нояб 2020.

*Аганов*  
Альберт Вартанович Аганов

