

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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 - биорганическая химия.

Диссертационная работа Минеева Константина Сергеевича посвящена разработке методов и подходов исследования пространственной структуры, внутримолекулярной подвижности, а также термодинамических и кинетических параметров функционально значимых взаимодействий мембранных белков в различных мембраноподобных средах с использованием спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

*Актуальность исследования* обусловлена, прежде всего, важной ролью мембранных белков в регулировании важнейших процессов в клетках: транспорта веществ через мембрану, передачи сигналов, поддержания или изменения мембранного потенциала. Кроме того, очень часто мембранные белки являются мишенями для воздействия лекарственных средств. При исследовании механизма влияния лекарств на мишени необходимо знание структуры белков и структуры образующегося комплекса. Для применения наиболее точного метода исследования структуры белков, рентгеноструктурного анализа, необходимо вырастить кристалл. Однако, для мембранных белков это возможно далеко не во всех случаях. Например, до настоящего времени не были закристаллизованы мембранные белки с одним трансмембранным сегментом. Одним из наиболее важных методов исследования пространственной структуры белков является метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Полученная с помощью метода ЯМР пространственная структура, как правило, используется для компьютерного моделирования оптимальной структуры лекарственного средства при поиске новых препаратов. Спектроскопия ЯМР в растворе очень широко применяется для исследования структуры мембранных белков (МБ). Для достижения необходимых для регистрации ЯМР параметров МБ как правило используется локализация МБ в специальных мембраноподобных средах (МПС). В диссертации Минеева К.С. проведена большая работа по оптимизации МПС, что позволило получить частицы, имитирующие клеточную мембрану, и оптимизировать методы ЯМР-спектроскопии для работы с объектами большого размера.

*Новизна* полученных результатов не вызывает сомнений и заключается в разработке универсального метода измерения размера, концентрации "свободного" детергента и определения фазового состояния бицелл. Применяя разработанные "модели идеальной бицеллы" можно легко предсказать размер и свойства частиц МПС, в зависимости от концентрации и свойств отдельных компонентов смеси липидов и детергентов.

Разработаны новые импульсные последовательности ЯМР спектроскопии, которые могут применяться для сверхточной детекции межмолекулярных контактов, предложены новые методы картирования интерфейсов и предсказания структуры димеров МБ. С использованием методик ЯМР были определены 12 новых пространственных структур МБ в различных олигомерных формах, таким образом получены новые знания о существовании различных возможных конформаций димеров ТМД и о механизмах активации ряда белков. Обнаружено, что толл-подобные рецепторы содержат чрезвычайно длинные ТМ  $\alpha$ -спирали, включающие в себя заряженные аминокислоты и богатые ароматическими остатками. Предложена первая модель TLR, основанная на экспериментальных данных о структуре всех трёх доменов белка.

Предложен новый подход к анализу белков на уровне "ансамбль состояний - энергия состояний - подвижность - окружение - функция" и объяснение роли липидного окружения в процессах активации ряда клеточных рецепторов.

**Практическая значимость работы** заключается в том, что разработанные в диссертации новые методы измерения свободной энергии взаимодействия МБ в частицах МПС могут быть в дальнейшем применены к большому классу МБ и использоваться для получения структурной информации. С использованием разработанных в диссертации методов изучены свойства нескольких десятков различных составов бицелл, которые в дальнейшем могут быть использованы при рациональном планировании экспериментов. Эти методы позволяют предсказать размер и свойства частиц МПС, в зависимости от концентрации и свойств отдельных компонентов смеси липидов и детергентов, что может быть использовано при выборе экспериментальных условий проведения ЯМР исследований структуры МБ.

Предложенные новые методы измерения свободной энергии взаимодействия МБ в частицах мембраноподобных сред позволяют описать изменения структуры и стабильности димера трансмембранных доменов, происходящих под действием точечных мутаций, вызывающих активацию полноразмерного белка, и делать выводы о конформации димеров трансмембранных белков в различных функциональных состояниях рецептора. Этот подход может быть использован в дальнейшем для изучения влияния свойств окружения на структуру и стабильность димеров трансмембранных доменов МБ.

**Достоверность и новизна** полученных экспериментальных результатов, **высокая степень обоснованности научных положений и выводов**, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. В работе разработан ряд новых методов и подходов, основанных на ЯМР-спектроскопии, для исследования структуры МБ, в частности:

- метод изучения структуры частиц в смесях липид/детергент и определения составов, формирующих изотропные бицеллы;
- методы для определения межмолекулярных взаимодействий в димерах трансмембранных доменов, а также для быстрого картирования интерфейсов димеризации мембранных белков на основе ЯМР спектроскопии в растворе;
- метод для предсказания структуры димеров ТМД на основании изменений различных наблюдаемых параметров метильных групп при димеризации;
- методы измерения свободной энергии и равновесной кинетики димеризации МБ в мембраноподобных средах.

С применением разработанных методов получены следующие **новые результаты**:

- разработана модель, описывающая форму и размер бицелл в зависимости от соотношения белок/детергент;
- измерены параметры модели бицелл, сформированных различными липидами и детергентами;
- показана способность наиболее распространенных типов липидов формировать бицеллы;
- предложены и охарактеризованы бицеллы на основе детергентов Façade-EM и Façade-EPС ;
- определены пространственные структуры 12 димеров ТМД;
- показано, что точечные замены неполярных аминокислот на Glu, которые приводят к спонтанной активации рецепторов VEGFR2, вызывают изменение конформации димера ТМД, которому сопутствует его стабилизация;
- показано, что малые изменения в липидном окружении могут оказывать значительное влияние на стабильность димера ТМД. Измерена свободная энергия димеризации 11 белков;

- изучены структура и динамика ТМД HER, HER2, TLR4 и p75NTR с цитоплазматическими примембранными регионами. Показано, что наличие примембранных регионов может влиять на структуру трансмембранного домена;
- исследована пространственная структура и динамика конструкции, содержащей трансмембранный и полноразмерный внутриклеточный домен рецептора нейротрофинов p75, а также полноразмерного белка с одним трансмембранным сегментом NRADD;
- показано, что движения домена смерти p75 никак не сцеплены с движениями трансмембранного домена белка, как в мономерной, так и в димерной форме, что противоречит общепринятому механизму активации белка.

### **Структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, восьми глав, обзора литературы (главы 1-2), краткой характеристики объектов исследования (глава 3), обсуждения результатов (главы 4-7), экспериментальной части (глава 8) и выводов. Полный объем диссертации составляет 316 страниц с 101 рисунком и 11 таблицами. Список литературы содержит 548 наименований.

*Во введении* обсуждается актуальность исследования, цель работы, поставленные задачи, научная новизна и практическая значимость работ, основные положения, выносимые на защиту, перечислены конференции, на которых были доложены результаты работы.

В *первой* главе приведен обширный (60 страниц) литературный обзор, посвященный исследованию структуры белков методом ЯМР спектроскопии. Приведен краткий анализ основных типов доступных для применения мембраноподобных сред и обсуждается основная проблема исследования МБ - подходы для рационального подбора и оптимизации мембраноподобной среды для нужд конкретного исследования. Описаны методы солюбилизации мембранных белков в мембраноподобных среда; рациональные подходы к выбору мембраноподобного окружения, а также все возможные подходы и критерии выбора мембраноподобной среды для исследуемого МБ. Показано, что для каждого конкретного белка невозможно предсказать будет ли его структура нативной в том или ином окружении. В обзоре подробно описаны основные методики производства белков для нужд спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Подробно описаны различные способы изотопного мечения, с помощью которых можно оптимизировать поперечную релаксацию и упростить вид спектров ЯМР, уменьшив число сигналов.

Описаны и проанализированы новые методики ЯМР-спектроскопии для исследования белков большого размера, позволяющие оптимизировать продольную релаксации и существенно сократить время экспериментов.

В конце глава приведено перечисление нерешенных проблем для исследований МБ и фактически постановка задач исследования данной диссертации: а именно, ограниченность набора мембраноподобных сред, необходимость разработки стратегии выбора мембранных сред, проблемы с нативностью структур МБ при гетерологической продукции, дороговизна изотопно-меченых компонентов культуральных сред для гетерологической продукции, сложность в получении спектров ЯМР высокого качества для массивных объектов.

*Вторая глава диссертации* представляет собой также литературный обзор методов измерения свободной энергии взаимодействия мембранных белков (10 страниц).

Детально описаны методы SDS-электрофореза и метод Ферстеровского резонансного переноса энергии флуоресценции. Проведен анализ преимуществ и недостатков, разработанных в настоящее время методик для измерения свободной димеризации МБ.

*В третьей главе* описаны объекты исследования. Краткая характеристика объектов исследования.

*В четвертой, самой обширной главе* диссертации, состоящей из 15 разделов, описаны результаты разработки методов анализа свойств мембраноподобных сред, параметры малых изотропных бицелл различного состава. Автору диссертации удалось разработать методы исследования структуры изотропных бицелл на основе спектроскопии ЯМР, по измерению размера частиц в зависимости от  $q$  и температуры, концентрации свободного детергента и регистрации фазовых переходов. Предложенные подходы были использованы для характеристики целого ряда составов бицелл. Для наблюдения фазовых переходов была разработана специальная методика на основе спектроскопии  $^31P$ .

Автору удалось впервые продемонстрировать фазовые переходы в самых малых частицах липидов и показать, что основные черты фазового поведения липидных бислоев воспроизводятся в изотропных бицеллах. Для десятков различных составов были измерены такие параметры как размер частиц и концентрация детергента в мономерной форме. Исследована температурная зависимость структуры бицелл радиусом свыше 4 нм и обнаружено, что они могут увеличиваться в размере при нагреве выше критической температуры, что вызвано обратимым слиянием бицелл при соударениях. Изучены параметры бицелл с модельными трансмембранными белками, разработаны методы измерения радиуса частиц с белком на основании кросс-скореллированной релаксации  $^1H$ - $^{15}N$ , предложены модели, описывающие размер частиц с белком и согласующиеся с экспериментальными данными, показано, что в зависимости от ободобрающего агента может изменяться стабильность и подвижность ТМ белка, а также параметры взаимодействия белок/липид. Главным результатом этой большой проведенной автором диссертации работы является возможность для исследователей предсказать параметры объектов в растворах бицелл при изучении влияния окружения на свойства МБ.

*В пятой главе* приведены полученные результаты картирования изменений химических сдвигов и параметров подвижности. Автором диссертации разработана методика для определения пространственной структуры гомодимеров ТМ доменов МБ на основе ЯМР-спектроскопии в мембраноподобных средах и гетероядерной фильтрации спектров ядерного эффекта Оверхаузера, и найден оптимальный подход, основанный на фильтрации по  $^{13}C$  и последующей регистрации сигналов метильных групп. Проведен анализ возможности прогнозирования различных измеряемых параметров ЯМР амидных и метильных групп МБ в отношении интерфейсов димеризации. Кроме того, автором предложен подход для построения моделей димеров МБ на основании наблюдаемых изменений параметров метильных групп при димеризации. В конце главы разработанные методики использованы для изучения пространственных структур димеров ТМД рецепторов семейств РТК и TLR, получено 12 пространственных структур димеров и две структуры тримеров МБ. Важным результатом является построение первой модели полноразмерного рецептора в димерном состоянии, использующая прямые экспериментальные данные о конформации всех трёх доменов TLR.

*В шестой главе диссертации* описаны и обсуждаются разработанные автором диссертации методы измерения свободной энергии и кинетики взаимодействия мембранных белков в мембраноподобных средах и их практическое применение.

Автором разработаны методики для измерения заселенностей олигомерных форм МБ по двумерным гетероядерным спектрам ЯМР и модели равновесия между олигомерными формами, которые могут быть применены для измерения свободной энергии взаимодействия МБ и исследования равновесной кинетики этого процесса в мицеллах детергента и липидных бицеллах. Разработанные методы применены для изучения поведения целого ряда односпиральных мембранных доменов МБ, а также измерена свободная энергия димеризации 11 белков. Практическая важность полученных данных состоит в возможности их

использования для установления взаимосвязи между структурой и энергией  $\alpha$ -спиральных МБ, необходимой для развития компьютерных методов анализа и предсказания пространственных структур МБ.

Отдельная *седьмая глава диссертации* посвящена методам исследования структуры крупных фрагментов клеточных рецепторов.

На основании полученных результатов анализа структуры крупных фрагментов МБ p75-ΔECD и NRADD автором сделан вывод что исследование крупных фрагментов МБ вместо отдельных доменов позволяет получить более достоверную информацию о структуре доменов МБ. Аналогичный вывод можно сделать и на примере исследования структуры димера HER2 с примембранными регионами и исследования архитектуры толл-подобных рецепторов (раздел 5.3.2). Другим важным аспектом важности исследования крупных доменов является информация о взаимосвязи между состояниями доменов. Последнее продемонстрировано автором на примере исследования динамики конструкции p75-ΔECD, где удалось продемонстрировать ошибочность предлагаемого ранее механизма активации рецептора p75NTR и предложить новые гипотезы, удовлетворяющие всем структурным данным.

В *восьмой главе* приведено краткое описание основных экспериментальных подходов и материалов.

В конце диссертации приведены выводы, список использованных сокращений и список литературных источников.

Вопросы и замечания по диссертации:

- 1) В главе 5, касающейся определения структуры димеров мембранных белков, автор обнаружил отсутствие необходимой предсказательной силы у изменения химических сдвигов амидных NH-групп и метильных групп, а так же КССВ C-C/N. Автором было предложено использовать параметры изменения подвижности метильных групп для предсказания интерфейсов димеризации, в частности изменение времени корреляции  $t_c$  метильных групп, характеризующих их быстрое вращение порядка пкс. Однако, остается не понятным можно ли с этой целью использовать аналогичный подход для анализа изменений подвижности непосредственно амидных групп?
- 2) При исследовании рецептора нейротрофина p75NTR (глава 7.2.2.) приводится сравнение индексов вторичного химического сдвига ядер Ca и Co белка p75-TM-чоппер в мицеллах DPC. При этом в неупорядоченном домене «чоппер» отчетливо наблюдается аномалия для сдвига Co для одного из центральных аминокислотных остатков (даже большая чем для C-концеваоой aa). Есть ли этому объяснение?
- 3) Имеются также мелкие замечания по оформлению:

Стр. 14 «спектроскопии»...

Стр.16 «модно» вместо «можно»

Стр. 18 «гидрадинамический»

Стр. 22 «однородности» .....

Стр. 29 «концентрацию»

Стр. 49 «ван-дер-ваалсовыским»

Стр. 57. «спектроскопия» и это список можно продолжить.

Иногда встречаются сложноподчиненные предложения, состоящие из трех-четырех простых предложений, иногда и не связанных между собой, а также не разделенных знаками препинания (запятыми или точкой с запятой).

Указанные замечания ни в коей мере не умаляют достоинств этой замечательной диссертации высокого научного уровня.

В целом диссертация хорошо оформлена, написана хорошим ясным языком и содержит не слишком много грамматических ошибок и опечаток. Автором диссертации проведен очень большой объем экспериментальной работы и разработан целый ряд новых методов и подходов для исследования структуры мембранных белков и измерения свободной энергии и кинетики взаимодействия мембранных белков в мембраноподобных средах. Разработанные методы применены для практического изучения целого ряда мембранных белков. Полученные результаты и проведенные эксперименты свидетельствуют о высокой научной квалификации автора в области применения метода ЯМР к задачам исследования структуры и динамики биомолекул. Диссертация является законченной научно-исследовательской работой, в которой решена задача создания методов, основанных на ЯМР спектроскопии, для определения структуры мембранных белков, а также методов измерения свободной энергии и кинетики взаимодействия мембранных белков в мембраноподобных средах. Основные результаты работы опубликованы в 23-х статьях в ведущих высокорейтинговых зарубежных и российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для публикации материалов диссертаций, и 17 тезисах докладов российских и международных конференций. Автореферат и опубликованные работы правильно и полно отражают содержание диссертационной работы.

Диссертационная работа Минеева Константина Сергеевича, безусловно, соответствует всем критериям (в том числе п.9), установленным "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 автор, Минеев Константин Сергеевич, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия.

Официальный оппонент

Доктор физико-математических наук, профессор,  
Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Новосибирского  
института органической химии им. Н.Н. Ворожцова  
Сибирского отделения Российской академии наук  
(НИОХ СО РАН)  
Заведующая отделом физической органической химии

Багрянская Елена Григорьевна

10 марта 2020 г.

Почтовый адрес: Россия, 630090.  
г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д.9  
Тел. (383) 330-88-50  
E-mail: [egbagryanskaya@nioch.nsc.ru](mailto:egbagryanskaya@nioch.nsc.ru)

Подпись Багрянской Е. Г. заверяю  
Ученый секретарь Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Новосибирского  
института органической химии им. Н.Н. Ворожцова  
Сибирского отделения Российской академии наук  
им. Н.Н.Ворожцова



к.х.н. Бредихин Роман Андреевич