

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУН Институт элементоорганических
соединений им. А.Н. Несмеянова

Российской академии наук

член-корреспондент РАН  А.А. Трифонов

«13» марта 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук 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»

Исследование структур различных биологических макромолекул является важным междисциплинарным направлением современной науки. Одними из активно изучаемых объектов в этой области являются разнообразные белки и полипептиды, так как их пространственная структура напрямую связана с их функциями в живом организме. Наиболее популярный физический метод определения структуры белков – рентгеновская дифракция монокристаллов – не всегда предоставляет информацию, имеющую непосредственное отношение к их биологической функции, поскольку структуры макромолекул в растворе и в монокристалле могут различаться. Ярким примером тому служат мембранные белки (МБ), части которых находятся в различном окружении - гидрофобном или гидрофильном. В этой связи спектроскопия ЯМР, несмотря на определенные сложности получения структурных данных и их последующего анализа, является более предпочтительным методом, так как позволяет исследовать структуру белков в их нативном окружении. Таким образом, **диссертационная работа Минеева Константина Сергеевича**, посвящённая разработке методов ЯМР-спектроскопии для изучения структуры мембранных белков, без сомнения, является **актуальной**.

Работа представляет собой логическое продолжение систематических исследований в области применения спектроскопии ЯМР для изучения биологических макромолекул, проводимых в ИБХ РАН.

Диссертационная работа (316 стр.) построена традиционным образом и состоит из введения, литературного обзора (гл. 1 и 2), краткой характеристики объектов исследования (гл. 3), обсуждения результатов (гл. 4-7), экспериментальной части (гл. 8), выводов и списка литературы, включающего 548 ссылок.

Во введении всесторонне обоснована актуальность, научная новизна и практическая значимость выбранной темы, связанной с разработкой новых ЯМР-методик определения структур мембранных белков; четко сформулированы цели и задачи диссертационного исследования.

В литературном обзоре, включающем две главы (гл. 1 и 2), подробнейшим образом обсуждаются существующие методы и подходы, применяемые для исследования структуры мембранных белков при помощи спектроскопии ЯМР. Большой интерес представляет раздел 1.1, в котором автор уделил особенное внимание вопросу имитации нативного окружения мембранных белков в условиях эксперимента ЯМР использованием разнообразных мембраноподобных сред, что является критически важным для корректного изучения пространственной структуры мембранных белков.

В разделах 1.2. и 1.3 автор описывает существующие общие подходы, применяемые при изучении не только мембранных, но и других классов белков. В разделе 1.2. приведен подробный анализ разнообразных возможностей изотопного мечения для получения спектра ЯМР необходимого вида и оптимальных релаксационных характеристик. В разделе 1.3 автор обсуждает некоторые современные методики ЯМР, оптимизированные для определения пространственной структуры белков большого размера.

Глава 2 литературного обзора посвящена методам измерения свободной энергии димеризации мембранных белков. Поскольку все существующие подходы обладают определёнными ограничениями, данная глава закладывает основу и обосновывает актуальность одной из частных задач настоящего диссертационного исследования, связанной с разработкой метода определения свободной энергии и кинетики взаимодействия мембранных белков в мембраноподобных средах.

В совокупности главы 1 и 2 содержат множество ссылок (338), большая часть из которых относится к высокорейтинговым публикациям последнего десятилетия, что демонстрирует как актуальность, так и исчерпывающий характер данного литературного обзора. Несомненно, систематизация такого большого объема информации о методах пробоподготовки и регистрации данных ЯМР образцов мембранных белков легла в основу успешного выполнения поставленных в диссертационном исследовании задач.

В **Главе 3** приведен краткий обзор мембранных белков, изучение которых составляет предмет настоящей диссертации, и еще раз сформулирована актуальность и новизна таких исследований.

В **Главе 4** автор предлагает новый метод измерения размера бицелл, основанный на модели идеальной мицеллы и экспериментальном измерении коэффициента диффузии с помощью спектроскопии ЯМР. Работоспособность предложенного подхода подтверждается совпадением с результатами, полученных для широкого ряда систем при помощи других ранее разработанных методов. Не вполне ясным вопросом здесь остается корректность сравнения данных разных методов при условии сильного различия экспериментальных условий (например, температуры и фазового состояния бицелл), которые могли бы повлиять на итоговый результат. Были ли условия и модели описания экспериментальных данных идентичными во всех обсуждаемых случаях? Другим вопросом относительно корректности применяемой модели идеальной бицеллы является корректировка коэффициента диффузии отдельных компонентов состава (детергента и липида) с учетом различной концентрации частиц в образце. Необходима ли данная корректировка только лишь по причине различной вязкости? Если да, то будет ли эффективнее учитывать вязкость состава напрямую через уравнение Эйнштейна-Стокса для такой корректировки? Также не вполне ясно, каким образом был получен коэффициент диффузии липидов при бесконечном разбавлении (D_{lip}^0).

Автор тестирует предложенный подход на примере широкого ряда бицелл и заключает, что многие из них подчиняются модели идеальной бицеллы и, соответственно, могут использоваться в качестве мембраноподобных сред. Стоит отметить, что некоторые из них проявляют свойства неожиданного изменения размеров при изменении внешних условий, а также фазовый переход. В этой связи возникает вопрос о том, каким образом проверяется монодисперсность получаемых бицелл, ведь только при этом условии вычисленные геометрически размеры будут иметь смысл для будущей инкапсуляции молекулы мембранного белка.

Стоит отметить, что несмотря на вышеуказанные замечания, в данной главе автор систематизировал все имеющиеся в литературе данные о строении бицелл и на их основе разработал новый подход, позволяющий измерять и контролировать геометрические размеры получаемых бицелл, что, безусловно, крайне важно для успешного исследования мембранных белков.

Глава 5 посвящена разработке методов определения структуры димеров мембранных белков. Автор предлагает использовать ЯМР-характеристики метильных групп в качестве сенсоров межмолекулярных взаимодействий по причине того, что на

поверхности мембранного белка находится множество таких групп и они участвуют во взаимодействиях в мембране. Данная гипотеза выдержала проверку на модельных белках с известной структурой, а впоследствии – позволила установить пространственную структуру 14 димеров и тримеров мембранных белков. Однако не вполне очевидно, может ли разработанный метод быть перенесен на другие классы белков, так как выборка модельных соединений была довольно ограниченной. Несмотря на это, предложенный подход не только значительно расширил возможности спектроскопии ЯМР при изучении межмолекулярных взаимодействий между мембранными белками, но и показал несостоятельность некоторых других ЯМР-характеристик как индикаторов таких взаимодействий.

Глава 6 посвящена разработке методов изучения кинетики взаимодействия различных форм мембранных белков в мембраноподобных средах. В разделе 6.1 предлагается несколько подходов к измерению заселенностей олигомерных форм мембранных белков. Ввиду различных релаксационных характеристик имеющихся форм, автор рассматривает и оценивает эффективность нескольких вариантов корректировки наблюдаемых интенсивностей сигналов. Корректное определение олигомерного состава, безусловно, закладывает фундамент для правильного изучения кинетики взаимодействия мембранных белков, и методы, предлагаемые автором, прошли проверку на модельных соединениях. К сожалению, автор не оценил точность предлагаемых методов. В частности, следовало бы привести значения критерия рассогласования при аппроксимации зависимостей интенсивностей сигналов на рисунках 80А и 81Н, чтобы можно было понять, насколько точно могут быть измерены заселенности состояний.

В разделе 6.2 автор предлагает скорректированную модель кинетического равновесия между формами, учитывающую концентрацию мицелл, участвующих в процессе димеризации. Предложенная модель позволяет описать ранее полученные экспериментальные данные для белков FGFR3tm и VEGFR2tm в широком диапазоне концентраций мицелл в отличие от подхода, в котором концентрация мицелл не учитывается. Предложенные подходы успешно применены для нескольких белков, благодаря чему автору удалось выявить важные подробности кинетики взаимодействия их олигомерных форм.

Таким образом, в результате диссертационного исследования автором были разработаны новые подходы к изучению кинетики взаимодействия различных форм мембранных белков на основе спектроскопии ЯМР. Хотя данные подходы и имеют определенные ограничения, они значительно расширяют арсенал имеющихся методов и

могут считаться предпочтительными для широкого ряда случаев (в частности, для небольших белков, образующих ограниченное количество олигомерных форм).

Структуры крупных белков, разные части которых находятся в различном окружении, обычно изучают по частям, а итоговая структура формируется искусственным образом. Недостаток такого подхода в том, что теряется информация о взаимодействии между отдельными частями. Глава 7 посвящена применению спектроскопии ЯМР для исследования пространственной структуры крупных белков целиком, а также анализу взаимосвязей между отдельными их частями и их влиянию на общую структуру. Было показано, что добавление примембранных регионов может быть критически важным для корректного изучения поведения соседнего трансмембранного домена мембранного белка. В данном разделе диссертации автор не только указал на важность исследования структуры мембранных белков целиком, но и впервые осуществил это на примере NRADD, что является значимым научным результатом.

Диссертационная работа лишена существенных недостатков, которые могли бы препятствовать ее успешной защите. Тем не менее, по ней можно сделать несколько небольших замечаний:

1. Утверждение *"...чувствительность по фтору в спектрах ЯМР превышает чувствительность по протонам"* (стр. 49) является спорным, так как величины гиромагнитного отношения и природного содержания соответствующих изотопов говорят об обратном.

2. На стр. 136 указано, что сигнал сдвинут в область слабого поля, хотя, судя по соответствующему рисунку 39, наблюдается сдвиг в сильное поле.

3. Формулировка *"угол между связью и тензором"* (стр. 122) не совсем точна. Вероятно, речь идет об угле между связью и главной осью соответствующего тензора.

4. В диссертации также присутствует небольшое количество опечаток: *"сλεκтивно"*, стр. 47; *"оному"*, стр. 56; *"взаимную ориентации"*, стр. 74; *"существуем"* вместо «существует», стр. 134; *"момномерному"*, стр. 177; символ "A" вместо символа "Å" (ангстрем), стр. 180; *"не не коррелируют"*, стр. 219.

5. На стр. 30 автор отмечает, что *"каждая вторая публикация структуры МБ, определённой при помощи ЯМР в частицах МПС, наталкивается на критику рецензентов"*. Любопытно, получена ли данная статистика из личного опыта автора или относится к более широкой выборке.

Указанные неточности и замечания не являются критичными, а потому несколько не снижают научной ценности проведенного исследования. В целом, в настоящей диссертационной работе систематизируется огромный объем разрозненных знаний о

методах исследования структур мембранных белков, на основе которых автор разрабатывает **новые оригинальные** подходы и грамотно их аргументирует. Предлагаемые подходы находят полное подтверждение при исследовании модельных и ранее не изученных объектов и, как следствие, представляют несомненную **практическую ценность** для всех исследователей, работающих в этой области. Настоящая работа может служить прекрасным руководством для ученых, заинтересованных в определении структуры мембранных белков методами спектроскопии ЯМР, поэтому полученные в ней результаты могут быть использованы во многих научных учреждениях химической и биохимической направленности, включая Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (ИМБ РАН), Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН (ИНБИ РАН), Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН), Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (ОБН). Основные результаты работы полностью отражены в научной печати. По теме диссертации опубликовано 23 статьи в международных рецензируемых журналах, таких как Chemical Science, Langmuir, Proteins, Journal of Biomolecular NMR, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для публикации материалов диссертаций. Результаты работы были представлены на 17 известных международных конференциях.

Обоснованность и достоверность полученных в работе результатов и сделанных на их основе выводов не вызывает сомнений. Очевидно, что автором проделана очень объемная работа, требующая **высокой квалификации** в различных областях химии, биохимии и спектроскопии, а также глубокой предварительной теоретической проработки.

Личный вклад Минеева К.С. в диссертационную работу является определяющим, так как он проделал значительный объем как теоретической, так и экспериментальной работы. Автореферат диссертации соответствует основным положениям диссертации, ее содержанию, выдержан по форме и объему.

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа Минеева Константина Сергеевича «Разработка методов ЯМР-спектроскопии и их применение для исследования олигомеризации мембранных белков» по актуальности темы, научной новизне, практической значимости полученных результатов, обоснованности сделанных выводов и уровню исполнения является логически законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной научной проблемы определения структуры мембранных белков в мембраноподобных средах при

помощи спектроскопии ЯМР. Диссертационная работа полностью **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 диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре Лаборатории ядерного магнитного резонанса ИНЭОС РАН (протокол № 1 от 25 февраля 2020 г.).

Текст отзыва составили:

1) Павлов Александр Александрович, кандидат химических наук по специальностям 02.00.08 – «элементоорганическая химия» и 02.00.04 – «физическая химия», старший научный сотрудник Лаборатории ядерного магнитного резонанса Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

Почтовый адрес: 119991, ГСП-1, Москва, В-334, Ул. Вавилова, 28

Рабочий телефон: +7 (916) 075-89-39

e-mail: pavlov@ineos.ac.ru

2) Новиков Валентин Владимирович, доктор химических наук по специальности 02.00.04 – «физическая химия», заместитель директора ИНЭОС РАН по научной работе, ведущий научный сотрудник Лаборатории ядерного магнитного резонанса Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

Почтовый адрес: 119991, ГСП-1, Москва, В-334, Ул. Вавилова, 28

Рабочий телефон: +7 (499) 135-65-68

e-mail: novikov84@ineos.ac.ru



/Павлов А.А./

/Новиков В.В./

Подписи Павлова А.А. и Новикова В.В. удостоверяю,

Ученый секретарь ИНЭОС РАН,

К.х.н. Гулакова Е.Н.

