

## 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 – биорганическая химия

Диссертационная работа Константина Сергеевича Минеева посвящена разработке методов для ЯМР-спектроскопии и их применению к исследованию строения мембранных белков и, в особенности, их олигомеризации.

Актуальность работа К.С. Минеева очевидна – ведь мембранные белки охватывают около трети всего разнообразия белковых молекул и являются мишенями чуть ли не половины современных лекарств, а дизайн лекарства требует знания пространственной структуры белка-мишени. Однако трудоемкость установления структур мембранных белков такова, что доля расшифрованных пространственных структур этих белков на порядок меньше, чем доля установленных структур водорастворимых белков. При этом, из-за сложности кристаллографического исследования мембранных белков, значительная часть работы по расшифровке пространственных структур мембранных белков ведется методами ЯМР.

Диссертационная работа К.С. Минеева начинается с традиционного литературного обзора, написанного очень хорошо. Он посвящен методам исследования структур мембранных белков при помощи спектроскопии ЯМР. Так как основная проблема исследования мембранных белков – рациональный подбор мембраноподобной среды для нужд конкретного исследования, то в первой части обзора особое внимание уделено мембраноподобным средам, в которые помещаются исследуемые спектроскопией ЯМР белки: детергентам, мицеллам, бицеллам, липид-белковым нанодискиам, а также стратегии выбора конкретной среды для конкретного исследования. При этом учитывается влияние мембраноподобного окружения на структуры мембранных белков. Диссертант уделил также серьезное внимание набору методик ЯМР-исследований, в том числе методу TROSY (ЯМР-спектроскопии с оптимизированной поперечной релаксацией), методам изотопного мечения исследуемых белков и системам для их гетерологической продукции; дополнительная информация содержится в главе 8 – "Экспериментальная Часть".

Во второй части литературного обзора К.С. Минеев сжато рассмотрел разнообразные экспериментальные методы, применяемые, наряду со спектроскопией ЯМР, для



исследования взаимодействия мембранных белков. В заключительной части обзора он кратко охарактеризовал объекты своих экспериментальных исследований, коими являются в основном белки с одним трансмембранным сегментом (имеющим форму  $\alpha$ -спирали) и их димеры; дополнительная информация о мембранных белках, а также липидах, растворителях и детергентах содержится в главе 8 – "Экспериментальная Часть" – и отчасти в главе 4.

Четвертая глава диссертации посвящена разработке методов анализа свойств мембраноподобных сред, в основном – бицелл (где белок окружен липидом, как в клеточной мембране, и еще дополнительным «ободом» из детергента, препятствующим слипанию этих бицелл), а также липид-белковых нанодисков (где имеющий аналогичное назначение «обод» состоит не из детергентов, а из специальных белков).

Диссертантом разработаны оптимальные методы приготовления бицелл, методы контроля размера частиц и детекции фазовых переходов в бицеллах

В диссертации рассматриваются бицеллы с ободком из различных детергентов как при различных соотношениях липид/детергент в растворе в целом (т.е. учитывая, что часть детергента остается в свободном, не связанном с бицеллами состоянии; это соотношение обозначается как  $q$ ), так и при различных соотношениях липид/детергент внутри собственно бицелл (это соотношение обозначается как  $q'$ ). Особое внимание уделяется «идеальным бицеллам», в которых поверхностно-активное вещество (детергент) не смешивается с липидом, что позволяет исследовать мембранные белки в чисто липидном окружении, наиболее приближенном к нативному.

Диссертант тщательно исследовал теоретическую модель «идеальных бицелл», и затем, проведя соответствующие опыты, показал, что для ряда обод-образующих детергентов, бицеллы, близкие по всем своим наблюдаемым свойствам к идеальным в достаточно широком диапазоне соотношений ( $q'$ ) липид/детергент в них, образуются при  $q' \lesssim 1$ .

Все это потребовало от диссертанта разработки методики точного измерения размера бицелл, их концентрации, и концентрации свободных молекул детергента.

Опыты базировались на измерении коэффициентов диффузии бицелл и детергента в растворе – при разных температурах и соотношениях липид/детергент ( $q'$ ) – с помощью спектроскопии ЯМР с использованием изотопа  $^{31}\text{P}$ ; дополнительно привлекались и литературные данные по рассеянию света и нейтронов. При этом оказалось, что размер бицелл, имеющих соотношение липид/детергент  $q' \lesssim 1$ , не зависел от температуры по крайней мере до  $40^\circ\text{C}$ ; они получались относительно небольшими (весом до 40 кДа), т.е.



пригодными для ЯМР-исследования включаемых в них белков. При этом ЯМР-исследования показали, что трансмембранный белок окружен фосфолипидами, а не детергентом, и что фосфолипиды не смешиваются с детергентом.

В то же время бицеллы с теми же детергентами при соотношении в них липид/детергент  $q' \geq 1$  (а также бицеллы, полученные с использованием ряда других детергентов и при  $q' < 1$ ) получались – при температурах выше  $\approx 25^\circ\text{C}$  (т.е. при температурах выше точки фазового перехода гель - жидкий кристалл в мембранах) – более крупными, чем это допускалось моделью «идеальных бицелл» (где липид не смешивается с детергентом), и к тому же оказывались слишком большими для ЯМР-исследования включаемых в них белков.

При этом обнаружилось новое, не наблюдавшееся до тех пор явление - размер таких "больших", с высоким содержанием детергентов бицелл рос с температурой. Полученный рост размера бицелл оказался лишком велик для того, чтобы его можно было бы объяснить переходом гель - жидкий кристалл в липиде, и предположительно связан с изменением структур "больших" бицелл (смешением в них липидов с детергентом).

Обнаружилось и другое новое, не наблюдавшееся до тех пор явление – "фракционный" фазовый переход в малых бицеллах, при котором эти бицеллы разделяются на две, различающиеся по размеру частиц фракции.

Переход этот происходит при температурах ниже  $37^\circ\text{C}$  (с приближением к температуре фазового перехода в липидах мембраны), При этом сигнал ЯМР от  $^{31}\text{P}$  атомов фосфолипидов становится расщепленным, причем заселенности двух фракций бицелл, соответствующих двум обнаруженным пикам, зависят от температуры. Анализ отвечающих этим двум фракциям коэффициентов диффузии выявил существенное различие радиусов входящих в них частиц. Это доказывает, что две фазы "начинки" не сосуществуют внутри одной бицеллы, а отвечают разным, сосуществующим в диапазоне  $\sim 15^\circ$  бицеллам – гелевым (более крупным) и жидкокристаллическим; при этом доля последних падает с падением температуры. Иными словами, существующие при высоких температурах жидкокристаллические бицеллы превращаются в гелевые переходом типа "все-или-ничего", без наблюдаемых интермедиатов.

К сожалению, диссертант упустил возможность более внимательно рассмотреть интересную аналогию между хорошо известными переходами типа "все-или-ничего" в глобулярных белках и открытыми им переходами типа "все-или-ничего" в бицеллах.



Дальнейшие опыты показали, что изотропные бицеллы малого размера, получающиеся при использовании детергентов с низкой критической концентрацией мицеллообразования, хорошо воспроизводят свойства бислойных мембран.

Исследования липид-белковых нанодисков (отороченных белком, а не детергентом) показали, что их свойства соответствуют характеристикам «больших» бицелл; в них также нет «фракционности» фазовых переходов, и они великоваты для ЯМР-исследований содержащихся в них белков

Я позволю себе не вдаваться в анализ тщательно собранных и исследованных диссертантом характеристик множества изученных им детергентов и липидов. Достаточно сказать, что эта работа привела к очень ценному, практического полного справочнику по поведению бицелл различного состава в зависимости от температуры и концентрации компонентов смесей.

Вообще, четвертая глава диссертации производит особенно хорошее впечатление.

Тем более досадны огрехи в ее оформлении. Почти на всех графиках приведены лишь относительные концентрации липидов и детергентов ( $q$  или  $q'$ , но почему-то не обе вместе), а абсолютные концентрации отсутствуют; и погрешности измерений отсутствуют почти всегда. В тексте же очень часто – в главе 4 и особенно в последующих – вместо термина "свободная энергия" употребляется просто слово "энергия", что путает читателя (по крайней мере – меня).

Следующая, 5-я глава диссертации посвящена разработке методов определения структуры димеров мембранных белков. Так как димеры образуются двумя одинаковыми белками, для их различения ЯМР-спектроскопией был предложен метод изотопной фильтрации, в котором одновременно используются молекулы с двумя типами изотопного мечения.

Проанализировав различные варианты изотопной фильтрации, диссертант показал, что оптимальной основой для определения структуры димеров трансмембранных спиралей (как в мицеллах, так и в бицеллах) является фильтрация ЯМР спектров по сигналам  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ , с детекцией контактов метильных групп белка, а детекция амидных групп не годится для определения контактов мономеров в димере. Наиболее же показательной в отношении интерфейсов димеризации является скорость вращения метильной группы вокруг связи  $\text{C-C}$ . Представленные образцы фрагментов спектров весьма убедительны.

В результате были получены, представлены в диссертации и помещены в PDB структуры 12 трансмембранных димеров и двух тримеров мембранных белков. В числе изученных димеров – трансмембранные домены нескольких рецепторных тирозинкиназ



(РТК) и толл-подобных рецепторов (TLR). Полученные структуры использовались для построения моделей полноразмерных белков, включающих не только трансмембранные, но и внеклеточные домены.

Особое внимание уделено при-мембранным участкам их структур. Полученные в разных бицеллах и мицеллах структуры похожи, но не тождественны. Их сравнение позволило высказать гипотезу о липид-опосредованном механизме активации изученных белков.

К сожалению, представленные в диссертации картинки структур не показаны в виде стереоизображений (так что красота этих трехмерных объектов теряется), и не проиллюстрированы типичными для ЯМРовских работ наложениями друг на друга всего множества ходов цепи, совместимых с результатами ЯМР-спектроскопии.

6-я глава диссертации, "Разработка методов измерения свободной энергии и кинетики взаимодействия мембранных белков в мембраноподобных средах" – самая, с моей точки зрения, неудачно изложенная (из-за присутствия в ней "свободной энергии") часть диссертационной работы.

На самом деле, основное содержание этой главы вполне интересно. Это – определение, по данным ЯМР, заселённости различных олигомерных форм белка в зависимости от концентрации ингредиентов (белка, липидов, детергентов) и от времени. Эти результаты получаются в опытах с мицеллами/бицеллами, хорошо описанными в главе 6 и в предшествующих главах.

Зачем потом диссертанту потребовалось переводить эти строгие результаты на язык "свободных энергий", базирующихся не на строгих, а на полуэмпирических-полуфеноменологических (т.е. годящихся в лучшем случае для численных интерполяций) формулах – неясно. Это ведь ничего не добавляет к эксперименту...

Величины же "свободных энергий", вычисляемые в главе 6 как  $RT \ln[\text{концентрации}]$  вообще не имеют абсолютного смысла, так как они (см. формулы (26), (27), (28)) зависят от единиц, в которых приведены концентрации! Так что, взяв концентрации, приведенные в молях на литр, получишь одни цифры для величин таких "свободных энергий", а взяв те же концентрации, приведенные в числе молекул на  $\text{см}^3$  – совсем другие цифры!

Кстати, в этой же главе дурную услугу диссертанту оказывает уже отмеченное выше слишком вольное смешение терминов "свободная энергия" и "энергия". Ведь здесь порой "энергией" (для краткости, видимо) зовется "свободная энергия" (вычисляемая, в данном случае, из концентраций), и она некорректно сравнивается с истинной энергией, – в данном случае, с теплотой, выделяющейся при связывании молекул (измеряемой



изотермической калориметрией).

Так что стоит обращать внимание не на приведенные в диссертации величины "свободных энергий димеризации", а на измеренные заселённости различных олигомерных форм белка, и их зависимость от концентраций всех ингредиентов (к сожалению, часто не приведенных на рисунках) и – в кинетических опытах – от времени.

Микрозамечание: в формуле (31) – опечатка: в числителе размерности не сходятся...

В главе 7-й и последней (не считая короткую вспомогательную главку 8, "Экспериментальная Часть") описываются методы исследования структуры крупных фрагментов клеточных рецепторов (из которых потом собирается цельная структура этих рецепторов) и результаты, полученные при этом с помощью разработанных в первых главах диссертации методов ЯМР-спектроскопии в приложении к исследованию мембранных белков и их олигомеризации.

Наиболее интересные результаты, полученные при исследовании такого рода, относятся к белку p75NTR, рецептору нейротрофинов, цитоплазматический домен которого содержит "чоппер"-домен на N-конце и "домен смерти" на C-конце.

"Чоппер"-домен оказался неупорядоченным во всех исследованных вариантах окружения. Он крайне подвижен в пико-наносекундном диапазоне. Его движения никак не сопряжены с состоянием трансмембранного домена, и он не взаимодействует с мембраноподобным окружением – так же, как и глобулярный, шестиспиральный "домен смерти". Эти свойства p75NTR противоречат имеющейся гипотезе о механизме его активации. В качестве альтернативы предложен механизм активации p75NTR при лиганд-индуцируемой его димеризации (олигомеризации?) с последующим разрезанием протеазами ( $\alpha$ - и  $\gamma$ -секретазами?); его необходимо проверить на клетках в будущем.

Аналогичное – но уже без деления на фрагменты – исследование структуры было сделано и для гомолога рецептора p75NTR, мономерного белка NRADD (или p45)

Резюмируя, можно сказать, что диссертационная работа К.С. Минеева является ценным оригинальным и интересным научным исследованием – правда, весьма трудным для чтения из-за обилия аббревиатур и (местами) опечаток, и недостатка запятых.

Его докторская диссертация вносит весомый вклад в развитие методов изучения мембранных белков и является вполне законченным трудом. Она выполнена на очень высоком уровне и содержит много новых научных и методологических результатов, причем результатов, чрезвычайно полезных для научного сообщества. Все эти результаты хорошо обоснованы и документированы.



Все отмеченные выше недостатки не умаляют качества самой диссертационной работы К.С. Минеева.

Достоверность выводов диссертационной работы не вызывает сомнений. Основные результаты работы К.С. Минеева опубликованы в 23 статьях в высокорейтинговых журналах, входящих в международные базы Web of Science, Scopus, причем К.С. Минеев часто является в этих статьях первым соавтором, что подчеркивает его ведущий вклад в опубликованные работы.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации (и так же, как она, перегружен аббревиатурами).

Учитывая все сказанное выше, можно заключить, что диссертация Минеева Константина Сергеевича «Разработка методов ЯМР-спектроскопии и их применение для исследования олигомеризации мембранных белков» соответствует требованиям (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) к докторским диссертациям, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Официальный оппонент  
заведующий лабораторией физики белка  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
"Институт белка Российской академии наук",  
член-корр. РАН, д.ф.-м.н., профессор

Алексей Витальевич Финкельштейн

Адрес: г. Пущино Московской обл., м-н «Г», д.23, кв.18  
E-mail: afinkel@vega.protres.ru  
Телефон: +7 903 257 6694

Подпись А.В. Финкельштейна заверяю  
Ученый секретарь Института белка РАН  
к.б.н. Никонова Е.Ю.

