

*На правах рукописи*

РАБДАНО Севастьян Олегович

РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ЯМР ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ  
МОЛЕКУЛ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

01.04.11 — физика магнитных явлений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург

2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель: **Скрынников Николай Русланович**

PhD, профессор, заведующий лабораторией биомолекулярного ЯМР ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Официальные оппоненты: **Польшаков Владимир Иванович**

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория магнитной томографии и спектроскопии, факультет фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»

**Николаев Борис Петрович**

кандидат физико-математических наук, руководитель группы, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России

Ведущая организация: ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Защита состоится «20» июня 2018 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.232.44 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Санкт-Петербургского государственного университета по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Средний проспект В.О., д. 41/43, ауд. 304.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 198504, Санкт-Петербург, ул. Ульяновская, д. 1, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.232.44 Комолкину Андрею Владимировичу.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. Диссертация и автореферат диссертации размещены на сайте [www.spbu.ru](http://www.spbu.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат физ.-мат. наук, доцент

А.В. Комолкин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Многие процессы и системы остаются недоступными для изучения по методологическим причинам. Одним из примеров подобных систем является гидратное окружение биологических молекул. Такие функции, как энзиматический катализ, связывание и распознавание целей, сопровождаются специфическими взаимодействиями с отдельными молекулами воды в гидратном окружении молекулы белка. Кинетика этих процессов определяется подвижностью молекул воды в гидратных оболочках, поэтому развитие методов изучения микроструктуры и динамики растворителя чрезвычайно важно.

Существующие модели гидратации недостаточно подробно описывают водное окружение гидрофильных и гидрофобных групп органических молекул. Авторы либо рассматривают гидратное окружение как единое целое (см. обзор литературы в А2 и ссылки внутри), либо пренебрегают малыми вкладами от определенных функциональных групп в измеряемые величины [1]. Для корректного описания гидратного окружения амфифильных молекул необходимы адаптированные модели гидратации гидрофобных и гидрофильных фрагментов.

Метод ЯМР имеет ряд преимуществ перед другими экспериментальными методами изучения гидратного окружения органических молекул [2]. Он использует сравнительно слабые магнитные взаимодействия ядер, это позволяет не возмущать наблюдаемые величины инструментом измерения. Ядерная магнитная релаксация намного чувствительнее к подструктурам растворителя, составляющим гидратные оболочки, чем такие методы, как, например, диэлектрическая релаксация.

Другим примером сложных для изучения с точки зрения методологии систем являются белки в агрессивных условиях окислительного стресса. Важность процессов протекающих с участием белков в таких условиях сложно переоценить. Одним из важных элементов системы редокс сигнализации и регулирования является антиоксидантная защита [3]. Общеизвестно, что окислительный стресс может отрицательно влиять на липиды, белки и ДНК. В случае белков типичными симптомами окислительного повреждения являются дестабилизация, нарушение функции и усиленный протеолиз [4, 5]. В общем случае, случайные окислительные модификации имеют тенденцию нарушать целостность и активность белка. Однако на данный момент опубликовано относительно мало работ, описывающих методы для детальной структурной характеристики окислительно поврежденных белков.

Основными мишенями окислительной модификации в белках являются тиольные группы цистеина, которые образуют дисульфидные связи. Зачастую этот процесс становится

критически важным в контексте болезни. Окислительный стресс приводит к образованию дисульфид-связанных агрегатов супероксиддисмутазы SOD1, которые связаны с боковым амиотрофическим склерозом [6, 7]. Тот же механизм применим для телец включений, образованных нейропатологическим белком TDP-43, которые также связаны с боковым амиотрофическим склерозом, а также лобно-височной дегенерацией [8]. По всей видимости, такие дисульфид-связанные белковые отложения образуются, когда клетка приближается к смерти, а редокс-гомеостаз сильно нарушен. Тем не менее, они явно остаются ключевым элементом нейродегенерации и потенциальной терапевтической мишенью [9].

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для глобулярных белков позволяет получить большой объем информации о процессах, происходящих при окислительном стрессе. Однако формирование агрегатных частиц делает невозможным применение стандартного арсенала многомерной гетероядерной спектроскопии ЯМР. При этом информация о структуре и способе формирования этих агрегатных частиц может быть чрезвычайно полезной для разработки лекарств от нейродегенеративных болезней, сопровождаемых формированием телец включения. По этой причине развитие методов ЯМР для изучения молекул белка в агрегированном состоянии является актуальной проблемой.

Третьим типом систем, обсуждаемых в диссертации, являются нативно разупорядоченные белки (IDP). IDP являются белками без четко определенной вторичной и третичной структуры. Они составляют около 25% всех белковых последовательностей [10, 11]. В IDP конформационная гибкость является основной характеристикой, которая сохраняется в процессе эволюции [12]. Знание динамики IDP необходимо для лучшего понимания функций IDP при нормальном гомеостазе и патологиях. Множество конформаций IDP в некоторых случаях включает в себя патогенные формы. IDP являются основной составной частью белковых включений при болезнях Альцгеймера, Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваниях [13, 14].

ЯМР релаксация  $^{15}\text{N}$  позволяет изучать динамику белков через функции спектральной плотности для пептидной плоскости в белках. Тем не менее, зачастую сложно определить вклады от различных мод движения белковой цепи. Для решения этой задачи представляется перспективным использовать совместный анализ экспериментальных данных ЯМР и моделирования МД. Как будет показано ниже, нам удалось разобраться в иерархии динамических мод.

Все вышеописанное дает ответ, почему различные области биофизики и медицины проявляют интерес к развитию новых методов и подходов в ЯМР спектроскопии,

релаксометрии и диффузометрии для получения информации о сложных для изучения состояниях биологических молекул.

### **Цель и задачи работы**

Целью данной работы является разработка методик ЯМР для изучения биологических молекул в состояниях, не позволяющих прямого наблюдения спектроскопией ядерного магнитного резонанса. Методики продемонстрированы на примере аминокислот и их водного окружения, олигомеров и агрегатных частиц белков, а также нативно разупорядоченных белков. Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. На основе изучения данных ЯМР релаксации ядер растворителя разработать методику, позволяющую построить модель гидратного окружения  $\omega$ -аминокислот и отдельных молекулярных групп, входящих в их состав.

2. Идентифицировать моды молекулярного движения ответственные за процесс ЯМР релаксации атомов  $^{15}\text{N}$  в основной цепи нативно разупорядоченных белков.

3. На основе методов ЯМР по возможности полно охарактеризовать структурные и динамические свойства белковых молекул при переходе из глобулярного состояния к разупорядоченному, агрегированному состоянию под воздействием окисляющих соединений.

### **Научная новизна**

Применен новый подход к совместному анализу данных ЯМР релаксации и квантово-химических расчетов, который позволил описать водное окружение органических молекул в виде системы, в которую входят гидратные оболочки отдельных гидрофильных и гидрофобных молекулярных групп. Получены новые данные о координационных числах и временах корреляции вращательного движения, а также их температурные и концентрационные зависимости, для молекул воды вблизи отдельных молекулярных групп органических молекул в водных растворах.

С помощью предложенного нового варианта ЯМР эксперимента для наблюдения H/D обмена амидных протонов основной цепи белка был доказан факт разупорядочивания белков на примере второго РНК-распознающего домена (RRM2) белка TDP-43 в составе агрегатных частиц, а также наличие обмена между состояниями глобулярного растворимого белка и агрегатами по механизму, основанному на реакции обмена тиол-дисульфид.

Данные о коэффициентах диффузии в полидисперсной системе, полученные методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля и методом динамического рассеяния света, впервые

были совместно интерпретированы для определения функции распределения частиц по размеру.

Впервые для двух доменов глобулярных белков, связанных в ненативный димер посредством дисульфидной связи, проведено моделирование молекулярной динамики.

Разработан метод анализа траекторий МД для нативно разупорядоченного белка, который позволил выделить и изучить различные моды молекулярного движения в полипептидной цепи.

### **Практическая ценность**

Разработанные методы исследования подвижности молекул воды вблизи отдельных молекулярных групп аминокислот, основанные на изучении ЯМР-релаксации ядер растворителя, могут быть использованы для получения параметров гидратации широкого спектра органических соединений.

С помощью новой методологии, развитой в диссертационной работе, становится возможным исследовать белки, подвергающиеся различным ковалентным модификациям, которые приводят к нарушению структурной целостности и к возникновению агрегированного состояния, изучение которого другими методами не представляется возможным.

Результаты, относящиеся к дестабилизации белка и формированию агрегатных частиц, позволяют по новому взглянуть на область рационального дизайна лекарственных препаратов на основе пептидов, связывающихся ковалентно со своей мишенью. Такие пептиды могут формировать ковалентную связь с распознаваемой мишенью и приводить к точечному воздействию на клеточные механизмы, тем самым приводя клетку к гибели. Ряд подобных пептидов был разработан в лаборатории Биомолекулярного ЯМР СПбГУ. Они продемонстрировали возможность успешного уничтожения раковых клеток (результаты опубликованы в работе [15]).

Разносторонняя характеристика систем, подобных изученному домену RRM2 из белка TDP-43, является существенным вкладом в понимание нейрпатологических процессов, вызванных окислительным стрессом.

Анализ спиновой релаксации ядер  $^{15}\text{N}$  в нативно разупорядоченном белке показал, что в современной литературе представлено неполное описание мод движения, отвечающих за ЯМР релаксацию. Новые данные, полученные из совместной интерпретации данных ЯМР релаксации и МД, позволили внести ясность в данный вопрос.

## Основные положения, выносимые на защиту

1. Сочетание метода ЯМР релаксации с квантово-химическими расчетами позволяет определять времена корреляции вращательного движения молекул воды в гидратном окружении отдельных функциональных групп органических молекул с большей достоверностью. В частности, было установлено: (i) времена корреляции вращательного движения молекул воды вблизи гидрофобной метиленовой группы в 1,5-2 раза длиннее, чем у объемной воды, в температурном диапазоне от 2 до 75°C; (ii) времена корреляции вращательного движения молекул воды в гидратных оболочках гидрофильных групп немного длиннее, чем в объемной воде при температурах выше 60°C, но при более низких температурах они составляют  $0,8 \div 1,0$  от значений времени корреляции для объемной воды.

2. Разработанный новый ЯМР-эксперимент на базе  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$  HSQC позволяет определять скорости H/D обмена в агрегатных частицах белков, формирующихся при окислительном стрессе. Данные по H/D обмену, наблюдаемому с помощью этого метода на изотопно-меченных образцах белка RRM2 показывают, что (i) дисульфид-связанные димеры могут служить зародышем агрегации белков, (ii) формируемые агрегатные частицы включают в себя не только развернутые димеры и олигомеры, но и развернутые мономеры, (iii) между фракцией растворимых мономеров и агрегированным белком происходит обмен за счет обменной реакции тиол-дисульфид.

3. На основе данных ЯМР по H/D обмену и рефолдингу, а также результатов компьютерного моделирования МД установлено, что дисульфид-связанные агрегаты (димеры и олигомеры) перешедшие в развернутое состояние под действием большой тепловой флуктуации, обладают низкой способностью к рефолдингу. Это приводит к постепенному переходу белка от нативного состояния к разупорядоченному.

4. Разработанная новая методика, основанная на совместном анализе данных измерений диффузии с помощью ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля и динамического рассеяния света, позволяет определить функции распределения белковых агрегатных частиц по размерам. В частности, на примере домена RRM2 белка TDP-43 показано, что размеры агрегатных частиц распределены по экспоненциальному закону.

5. Новый подход, заключающийся в том, что экспериментальные скорости релаксации ЯМР анализировались совместно с предсказанными МД скоростями, позволил извлечь сведения об основных модах движения, обуславливающих ЯМР релаксацию для атомов в основной цепи нативно разупорядоченных белков.

## **Личный вклад автора**

Постановка целей и задач диссертации была осуществлена совместно автором и научным руководителем – Н.Р. Скрынниковым. Разработка протоколов экспериментов, выполнение экспериментов, численные расчеты, обработка данных и большая часть компьютерного моделирования выполнены лично автором. Моделирование МД, описанное в главе 3, выполнено К. Кемпф. Основные результаты и выводы диссертации сформулированы лично автором. Публикации, лежащие в основе глав 1 и 2 диссертации, написаны автором, публикации, лежащие в основе главы 3, написаны в соавторстве с К. Кемпф. В подавляющем большинстве выступлений на конференциях по теме диссертации автор был основным докладчиком.

## **Апробация и достоверность работы**

Достоверность работы обеспечена использованием ряда независимых апробированных методов исследования биологических молекул для валидации результатов. Эти методы, как расчетные, так и экспериментальные, базируются на различных физических принципах, поэтому согласованность и воспроизводимость их результатов делает выводы диссертации надежно обоснованными.

По материалам диссертации автором сделаны доклады на следующих конференциях.

1. The 42<sup>nd</sup> FEBS Congress “From molecules to cells and back”, Иерусалим, Израиль, 2017.
2. 10<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, and 14<sup>th</sup> Winter Youth School-Conference «Magnetic Resonance and Its Applications», Санкт-Петербург, 2013-2017.
3. Актуальные проблемы трансляционной биомедицины, Санкт-Петербург, 2017.
4. XXXVIII Finnish NMR symposium, Ювяскюля, Финляндия, 2016.
5. 60<sup>th</sup> Biophysical Society Meeting, Лос-Анджелес, США, 2016.
6. International Student Conference «Science and Progress-2016», Санкт-Петербург, 2016.
7. Всероссийская конференция с международным участием «Окислительный стресс в психиатрии и неврологии», Санкт-Петербург, 2016.
8. XII International Workshop on Magnetic Resonance (Spectroscopy, Tomography and Ecology), Ростов-на-Дону, 2015.
9. EMBO Practical Course 2014: Multidimensional NMR in Structural Biology, Берлин, Германия, 2014.
10. International Symposium and Summer School in Saint Petersburg, Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter, 11<sup>th</sup> meeting: «Biomolecular NMR and related phenomena», Санкт-Петербург, 2014.



11. Молодежная конференция-школа «Физико-химические методы анализа в органической химии», Санкт-Петербург, 2013.
12. International Symposium and Summer School in Saint Petersburg, Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter, 10<sup>th</sup> meeting: «NMR in Life Sciences», Санкт-Петербург, 2013.
13. EUROMAR 2013, Херсониссос, Греция, 2013.
14. XV International Youth Scientific School «Actual problems of magnetic resonance and its application», Казань, 2012.

### **Структура работы**

Диссертация состоит из введения, трех глав и заключения. Работа изложена на 134 страницах и включает 35 рисунков и 2 таблицы. Библиографический список содержит 175 наименований.

### **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

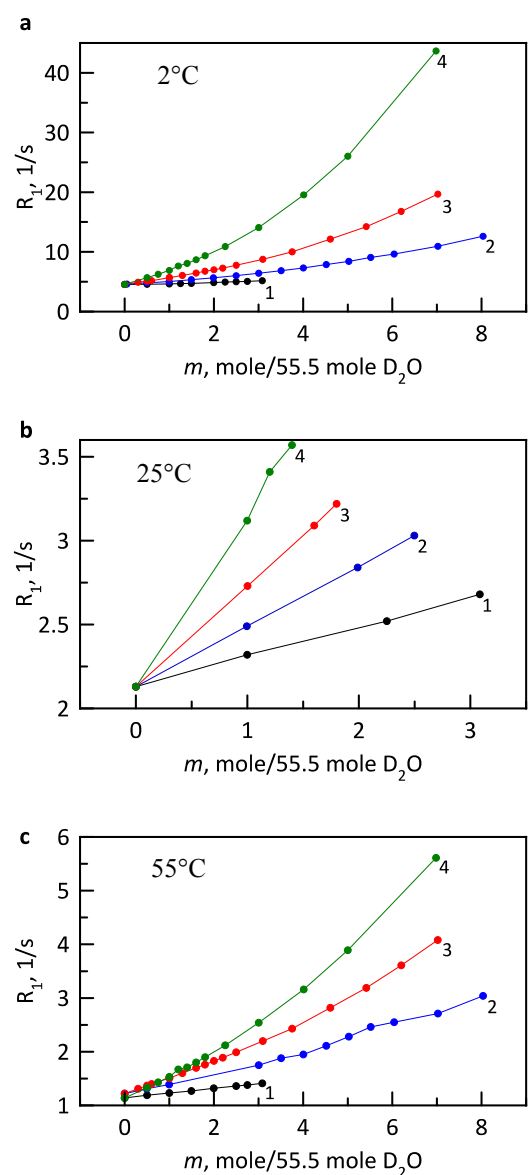
Во **введении** описаны актуальность, новизна и практическая ценность диссертации, поставлена цель и задачи, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, приводится информация о личном вкладе автора в проделанную работу, о достоверности и апробации результатов на семинарах и конференциях, о публикациях по теме работы, а также о структуре диссертации.

В последующих трех главах предлагаются новые подходы и методики ЯМР, а также обсуждаются результаты их применения к биологическим молекулярным системам, которые трудно изучать современными биофизическими методами.

**В первой главе** в начале дается краткий обзор состояния проблемы гидратации органических молекул. Далее даны детали теории ЯМР релаксации для систем с быстрым обменом, описание пробоподготовки и проведенных экспериментальных измерений. Затем рассматривается проблема разработки новых подходов для исследования гидратации амфифильных молекул с использованием данных ЯМР релаксации ядер растворителя и квантово-химических расчетов. Молекулы воды в гидратных оболочках гидрофобных и гидрофильных групп обладают различными структурными и динамическими свойствами, что явным образом отражается в измеряемых скоростях ЯМР релаксации ядер растворителя в растворах. Для  $N$  обменивающихся подструктур растворителя эти скорости  $R_1$  задаются следующим выражением

$$R_1 = \sum_i p_i R_{1i} \quad (1)$$

Здесь  $p_i$  и  $R_{1i}$  – относительная концентрация и скорость спин-решеточной релаксации для  $i$ -й подструктуры, соответственно. Для исследованных водных растворов  $\omega$ -аминокислот в  $D_2O$  выделяются гидратные оболочки групп  $NH_3^+$ ,  $COO^-$  и  $CH_2$ , а также подструктура свободного растворителя. В качестве примера, который может использоваться в контексте белковой биофизики, в работе изучаются скорости релаксации для растворов глицина (GLY),  $\beta$ -аланина (bALA),  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (GABA) и  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты (bACA) в  $D_2O$  (см. Рис. 1). При рассмотрении скоростей ЯМР релаксации  $^2H$  для образцов аминокислот, содержащих различные комбинации молекулярных групп, представляется возможным



**Рисунок 1.** Концентрационные зависимости  $R_1$  дейтронов в водных растворах GLY (1, черный), bALA (2, синий), GABA (3, красный) и bACA (4, зеленый) при 2°C (a), 25°C (b) и 55°C (c).

составить уравнения для вычисления скоростей релаксации  $R_{1i}$  для ядер дейтерия вблизи гидрофобной группы  $CH_2$  и гидрофильных  $NH_3^+$  и  $COO^-$  из измеряемых скоростей  $R_1$ .

Расчеты  $R_{1i}$  требуют значений координационных чисел для отдельных молекулярных групп. Они были определены с помощью квантово-химических расчетов с высоким уровнем теории (B3LYP/6-31++G(d,p)) для кластеров  $[GLY + 60 H_2O]$  и  $[bALA + 70 H_2O]$ . Полученные значения координационных чисел ( $n_{CH_2} = 7$ ,  $n_{NH_3} = 3$ ,  $n_{COO} = 4$ ) согласуются со значениями, оцененными из концентрационных зависимостей  $R_1$  по методу описанному в работе В.И. Чижика [16].

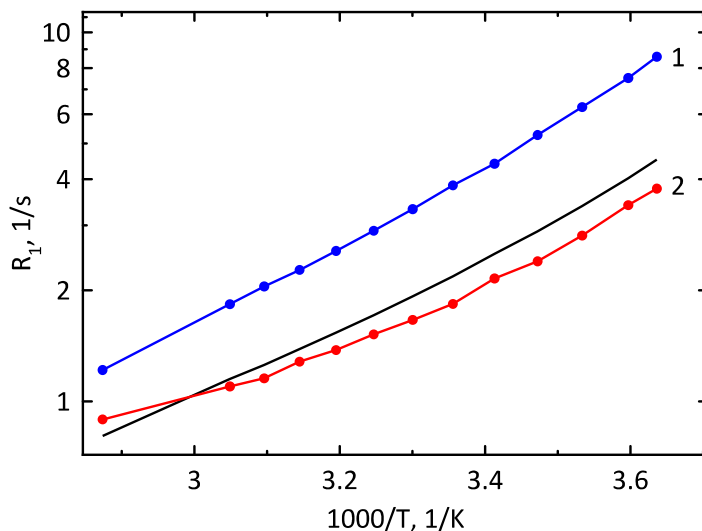
Таким образом, удалось получить координационные числа для молекулярных групп, а также с их помощью – относительные времена переориентации молекул  $D_2O$  в гидратных оболочках соответствующих групп ( $\lambda_i = \tau_{ci}/\tau_{c0}$ ,  $\tau_{ci}$  и  $\tau_{c0}$  – время корреляции вращательного движения для  $i$ -й подструктуры и объемной воды, соответственно; см. Таблица 1). Для полученных скоростей релаксации изучались температурные зависимости (см. Рис. 2), которые раскрыли новые особенности гидрофобного эффекта. Времена корреляции вращательного движения  $D_2O$  в гидратной оболочке метиленовой

группы аминокислот в  $1,5 \div 2$  раза длиннее, чем для чистой  $D_2O$  при  $T$  от 2 до  $75^\circ C$ . Времена корреляции вращательного движения  $D_2O$  в гидратных оболочках гидрофильных групп немного длиннее, чем в объемной воде при  $T > 60^\circ C$ , и составляют 0.8-1 от значений для объемной воды при  $T < 60^\circ C$ .

В конце первой главы рассматривается влияние медленного обмена аммонийных атомов водорода с растворителем на результаты предложенного в работе подхода и доказывається незначительность этого вклада в наблюдаемые скорости ЯМР релаксации.

Во второй главе вначале дается описание состояния проблемы разупорядочивания и агрегации белков при окислительно-восстановительных процессах. Затем приводятся детали пробоподготовки и экспериментальных измерений. При этом внимание уделено получению ЯМР спектров  $^1H, ^{15}N$  HSQC, отнесению сигналов, ЯМР релаксации, H/D обмену, ЯМР диффузометрии, динамическому рассеянию света (ДРС), гель-электрофорезу, протеолизу, сайт-направленному мутагенезу и микросекундному моделированию МД.

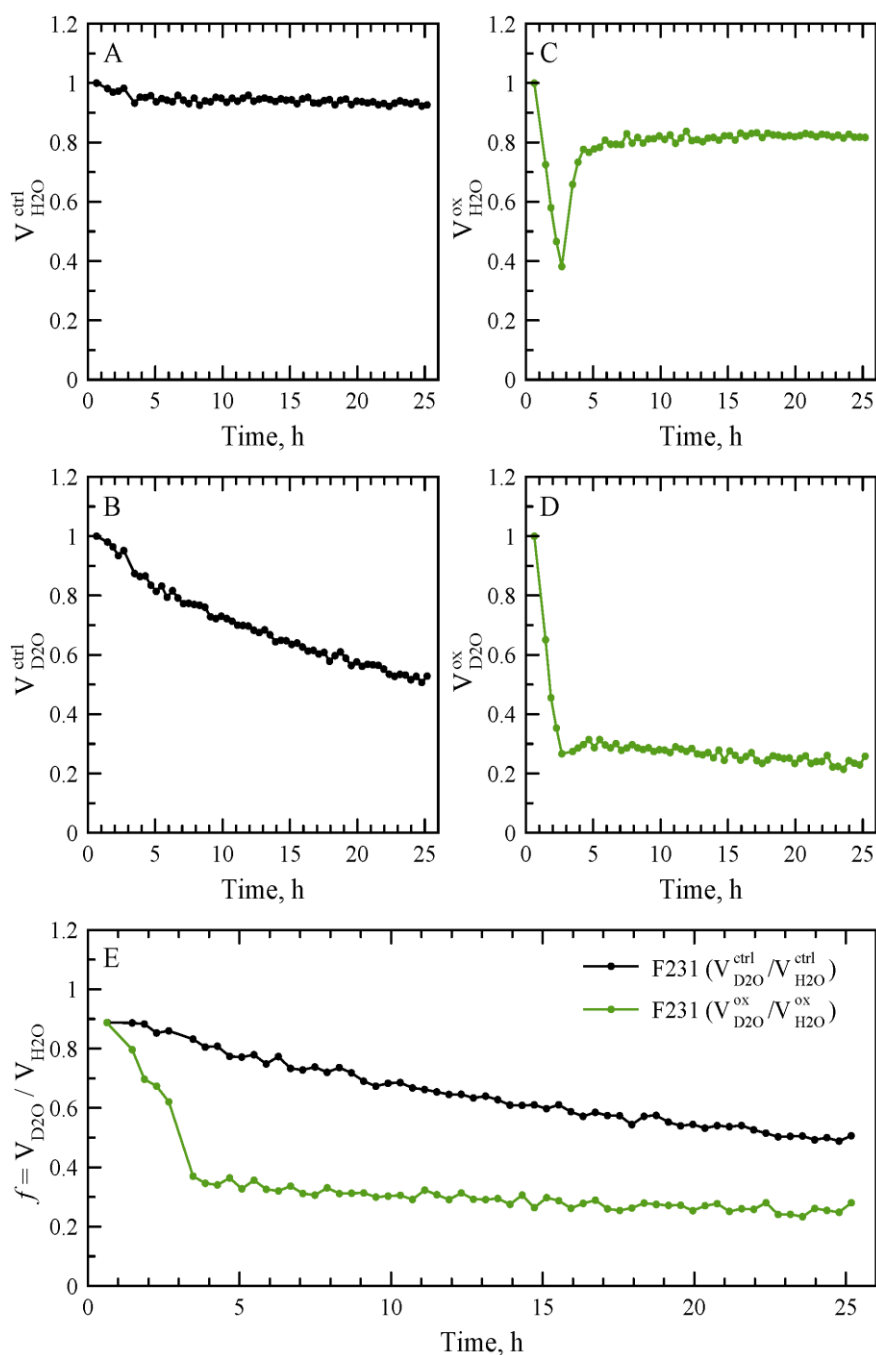
С помощью спектроскопии  $^1H, ^{15}N$  HSQC, а также измерений ЯМР релаксации и других вспомогательных биофизических методов показано, что в окислительных условиях RRM2 образует дисульфид-связанные димеры, которые разворачиваются, а затем собираются в агрегатные частицы (АЧ).



**Рисунок 2.** Температурные зависимости скоростей релаксации дейтронов воды в чистой  $D_2O$  (сплошная черная линия), в гидратных оболочках метиленовой группы (1, синий) и в гидратной оболочке карбоксильной и аммонийной групп (2, красный).

**Таблица 1.** Относительное время корреляции вращательного движения молекул воды в гидратной оболочке  $CH_2$  ( $\lambda_{CH_2}$ ) и в гидратных оболочках  $COO^-$  и  $NH_3^+$  ( $\lambda_{polar}$ ).

	2°C	25°C	55°C
$\lambda_{CH_2}$	2,0	1,8	1,6
$\lambda_{polar}$	0,8	0,9	1,0



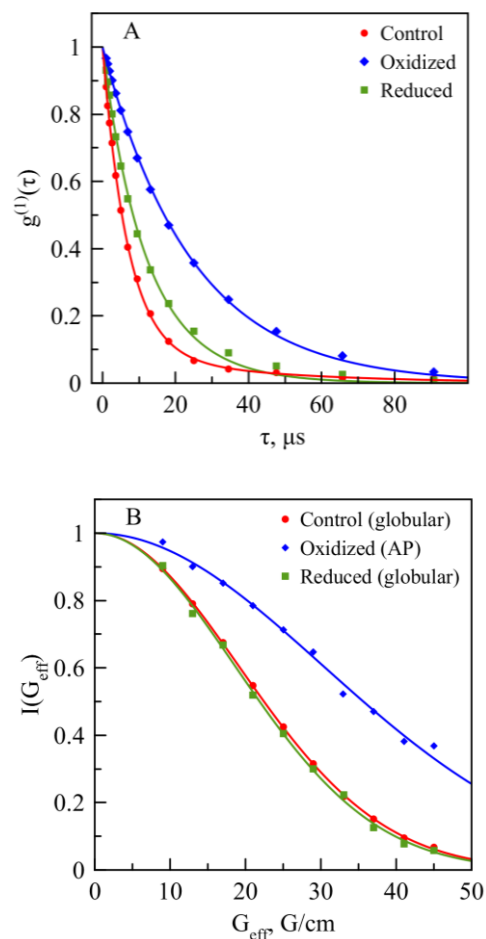
**Рисунок 3.** Данные Н/Д обмена для образца RRM2, подвергнутого окислению с последующим восстановлением: объемы спектрального пика остатка F231 в серии последовательно записанных спектров HSQC. (A) Контрольный (неокисленный) образец, 100% H<sub>2</sub>O буферный раствор. (B) Контрольный (неокисленный) образец, 80% D<sub>2</sub>O / 20% H<sub>2</sub>O буферный раствор. (C) Окисленный образец, 100% H<sub>2</sub>O буферный раствор. (D) Окисленный образец, 80% D<sub>2</sub>O / 20% H<sub>2</sub>O буферный раствор. Окисление образца заключалось в обработке 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течении 2 ч, от  $t = 55$  мин до  $t = 2$  ч 55 мин, и прерывалось обработкой 25 мМ ДТТ. (E) Отношения объемов пиков от образцов в дейтерированном и протонированном буферах,  $f_{ctrl} = V_{D2O}^{ctrl}/V_{H2O}^{ctrl}$  (черные символы) и  $f_{ox} = V_{D2O}^{ox}/V_{H2O}^{ox}$  (зеленые символы). Коэффициенты  $f_{ctrl}$  и  $f_{ox}$  служат мерой насыщения дейтерием в соответствующих образцах.

Классический эксперимент по Н/Д обмену не работает в системе, где постепенно формируются АЧ, потому что распад сигнала ЯМР обусловлен сразу двумя факторами: (1) переход белка в АЧ и (2) собственно Н/Д обмен. Кроме того, переход белка в АЧ происходит быстрее, чем Н/Д обмен, поэтому эксперимент становится малочувствительным к самому обмену. Нам пришлось создать новый эксперимент, где мы наблюдаем за сигналами в протонированном и дейтерированном буферах, чтобы разделить вклады (1) и (2), а также подвергаем образец окислению с последующим восстановлением, чтобы вернуть белок в глобулярную форму и восстановить интенсивность сигналов ЯМР. Степень насыщения дейтерием амидных групп в агрегатных частицах определяется по интенсивности сигналов

ЯМР в спектрах  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  BEST- HSQC [17] после того, как образец подвергается окислению перекисью водорода в течении 2 ч, а затем восстановлению с помощью дитиотреитола. Пример данных такого эксперимента приведен на Рис. 3 для аминокислотного остатка F231 домена RRM2 из белка TDP-43.

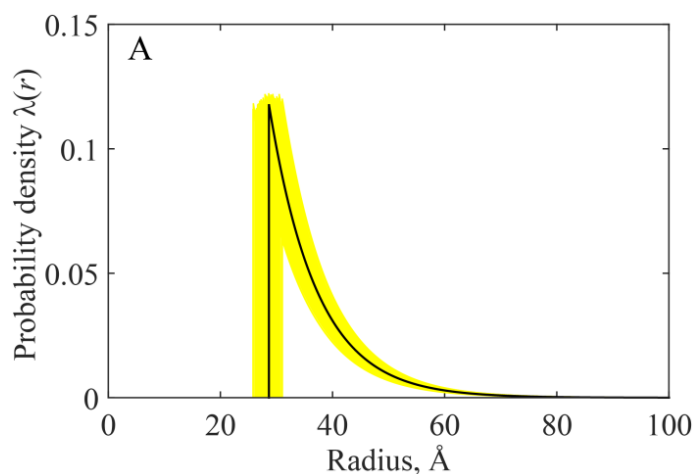
Предложенный эксперимент вместе с рядом других измерений применяется для изучения АЧ RRM2. При восстановлении окисленного образца путем обработки восстанавливающим агентом ДТТ обнаруживается, что основная часть белка восстанавливается до глобулярного мономерного состояния, однако остаточная фракция частиц на протяжении нескольких дней не проявляет признаков восстановления. Установлено, что АЧ представляет собой агрегацию пептидных цепей, связанных как дисульфидными связями, так и нековалентными взаимодействиями. С помощью обменного эксперимента было доказано, что пептидные цепи в АЧ сильно разупорядочены и неоднородны. С помощью спектроскопии ЯМР и гель-электрофореза было показано, что при добавлении протеазы трипсин к контрольному образцу белок остается структурно целостным, в аналогичном эксперименте на окисленном образце наблюдается быстрая протеолитическая деградация RRM2. Также было доказано, что АЧ могут захватывать/высвобождать мономерный RRM2 через реакции обмена тиол-дисульфид.

Для того чтобы охарактеризовать распределение АЧ RRM2 по размеру и смоделировать соответствующую функцию распределения предлагается совместный анализ коэффициентов диффузии полученных методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля и методом динамического рассеяния света. Интенсивность сигналов ЯМР зависит от радиуса АЧ  $r$ , как  $r^3$ , при условии независимости плотности АЧ от размера. В то же время, интенсивность рассеянного света пропорциональна  $r^6$ . Это означает, что метод динамического



**Рисунок 4.** (А) Автокорреляционные функции ДРС для контрольного, окисленного, и восстановленного образца (красные, синие и зеленые символы, соответственно). (В) Зависимость сигнала ЯМР от силы градиента  $G_{eff}$ , измеренная для глобулярного мономерного RRM2 в контрольном и восстановленном образцах (красные и зеленые символы, соответственно), а также для агрегатных частиц RRM2 в полностью окисленном образце (синие символы).

рассеяния света более чувствителен к АЧ большего размера, а ЯМР диффузометрия наоборот более чувствительна к меньшим частицам. На практике для обоих методов экспериментальные данные (диффузионное затухание сигнала, формально многоэкспоненциальное) хорошо описываются одной экспоненциальной функцией, отражающей эффективное значение размера АЧ (см. Рис. 4). Для АЧ RRM2 было показано, что измеренные коэффициенты диффузии различаются:  $D_{\text{ЯМР}} = 0,55 \pm 0,02 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$  и  $D_{\text{ДРС}} = 0,40 \pm 0,01 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$  в соответствии с вышеизложенными соображениями.



**Рисунок 5.** Распределение размеров АЧ в окисленном образце RRM2:  $\lambda(r) = \rho^{-1} \exp(-(r - r_{\min})/\rho)$ , ( $r \geq r_{\min}$ ), полученная путем оптимизации двух параметров:  $\rho = 8,5 \text{ \AA}$ ,  $r_{\min} = 28,6 \text{ \AA}$ . Желтые кривые отражают результаты моделирования методом Монте-Карло в соответствии с указанными выше погрешностями.

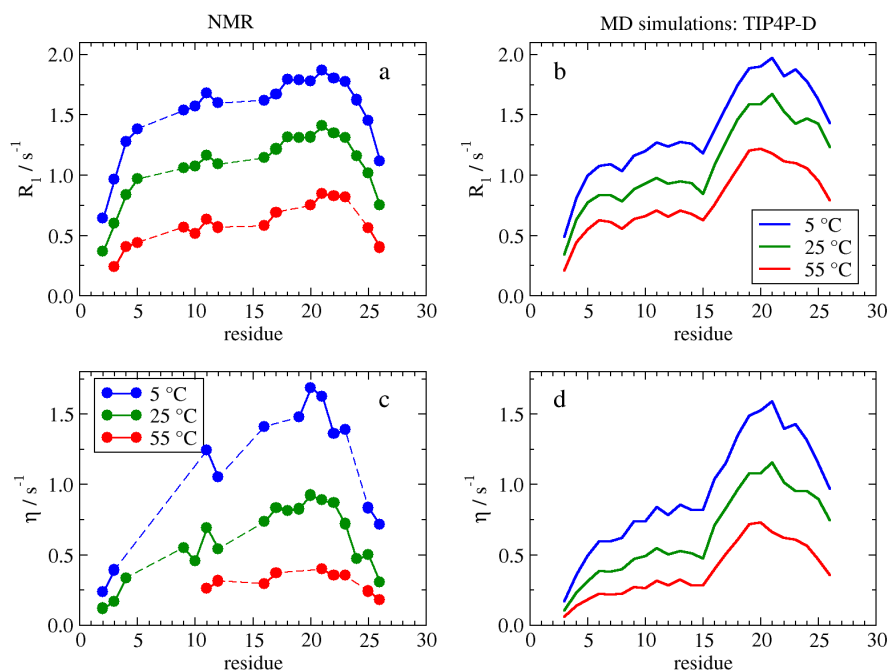
экспериментальных коэффициентов диффузии от модельных. Таким образом найти оптимальные параметры функции распределения АЧ. Описанный подход позволил определить для АЧ RRM2, что они в хорошем приближении описываются экспоненциальным распределением (см. Рис. 5).

Совокупность данных по ЯМР Н/Д обмену, рефолдингу и компьютерному моделированию МД позволила нам составить картину процессов, происходящих в системе RRM2 при воздействии окислительных соединений. Было показано, что сформированные вследствие окисления дисульфид-связанные димеры RRM2 могут быть стабильны на коротких временах (единицы мкс), однако на более длинных временах (минуты) они оказываются уязвимы для тепловых флуктуаций, разворачиваются и образуют АЧ. В восстановительных условиях дисульфидные связи разрушаются, происходит разрушение АЧ, рефолдинг белка и переход

Для моделирования функции распределения АЧ по размерам необходимо сделать следующие шаги. (i) Выбрать тип функции распределения и задать начальные параметры этой функции. (ii) Рассчитать данные для диффузионных спадов  $I_{\text{ЯМР}}(G_{\text{eff}})$  и  $I_{\text{ДРС}}(\tau)$  как в эксперименте, исходя из выбранного на первом шаге распределения. (iii) Аппроксимировать диффузионные спады и получить эффективные средневзвешенные коэффициенты диффузии. (iv) Составить и минимизировать функционал, заданный как квадратичное отклонение

равновесия обратно к мономерной глобулярной форме, хотя остается некоторая часть АЧ не поддающихся быстрому восстановлению.

**В третьей главе** рассмотрена динамика нативно разупорядоченных белков (IDP) в аспекте влияния на процесс ЯМР релаксации. Вначале дан краткий обзор литературы по вопросу различных типов движения в IDP, а также по моделированию молекулярной динамики для IDP с различными МД моделями воды. Описываются детали пробоподготовки, ЯМР экспериментов и компьютерного моделирования для N-концевого хвоста гистона



**Рисунок 6.** Сравнение экспериментальных и расчетных скоростей релаксации для МД-моделирования с водой TIP4P-D в образце <sup>15</sup>N H4. (a) Скорости ЯМР-релаксации <sup>15</sup>N  $R_1$ , измеренные при 5°C, 25°C и 55°C. (b)  $R_1$ , рассчитанные из MD-моделирования. (c) Скорости ЯМР-релаксации <sup>15</sup>N  $\eta_{xy}$ , измеренные при 5°C, 25°C и 55°C. (d)  $\eta_{xy}$ , рассчитанные из MD-моделирования.

H4 (25 аминокислотных остатков). Далее приводятся скорости ЯМР релаксации экспериментально измеренные для образца H4, а также полученные с помощью моделирования МД (см. Рис. 6). На основе сравнения данных эксперимента и моделирования при различных температурах обосновывается выбор модели воды TIP4P-D.

Можно выделить 4 типа молекулярного движения для IDP: (i) сверхбыстрые движения, (ii) колебания двугранных углов основной цепи белка  $\phi$  и  $\psi$ , (iii) скачки двугранных углов  $\phi$  и  $\psi$  и (iv) трансляционная и вращательная диффузия. Для изоляции каждого типа движения и соотнесения с временами корреляции, полученными из анализа движения вектора NH амидных групп IDP, проводится генерация модифицированных траекторий МД. В частности, для удаления эффектов диффузии производится выравнивание белковой молекулы между кадрами МД по атомам выбранной пептидной плоскости. Для разделения колебаний двугранных углов и скачков двугранных углов исходная траектория обрабатывается таким образом, что все значения двугранных углов устанавливаются на фиксированные значения в зависимости от

типа конформации. Тип определяется по принадлежности конформации (углы  $\phi$  и  $\psi$ ) к определенной области на карте Рамачандрана. Такой подход к анализу траекторий позволяет вычленивать вклады отдельных динамических процессов в ЯМР релаксацию. А именно в траектории МД с водой TIP4P-D выявлены моды движения, которые вносят наибольший вклад в ЯМР релаксацию  $^{15}\text{N}$ : колебания двугранных углов основной цепи белка вызывают релаксацию, как в гибкой (первые 15 аминокислот), так и в более структурированной части (С-конец) хвоста H4, однако для гибкой части существенный вклад составляют скачкообразные изменения этих углов, чего не наблюдается для структурированной части.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация представляет развитие методов ЯМР в нескольких направлениях. Во-первых, предложен ряд новых подходов ЯМР спектроскопии для белков в агрегированном состоянии, позволяющих с помощью наблюдения спектров глобулярной формы белка сделать выводы о степени разупорядочивания пептидных цепей в агрегированном состоянии. Также предложен метод для определения параметров распределения частиц по размерам в полидисперсной системе агрегатных частиц. Во-вторых, рассмотрение гидратной оболочки аминокислот как суперпозиции гидратных оболочек отдельных молекулярных групп и квантово-химические расчеты водного окружения сделали возможным определение характерных времен переориентационного движения молекул воды в этих гидратных оболочках. В-третьих, измерения ЯМР релаксации  $^{15}\text{N}$  в нативно разупорядоченных белках были интерпретированы совместно с данными моделирования МД, что позволило выявить основные моды молекулярного движения, ответственные за процесс ЯМР релаксации в подобных системах.

Методы ЯМР, а также ряд других вспомогательных биофизических методов, были применены для изучения систем, включающих в себя аминокислоты и белки. В каждой из трех рассмотренных систем было произведено всестороннее исследование свойств систем, что позволило достигнуть глубокого понимания процессов и физических явлений. В частности, можно привести следующие основные результаты и выводы.

1. Обнаружено, что при низких концентрациях аминокислот в  $\text{D}_2\text{O}$  скорости ЯМР релаксации ядер  $^2\text{H}$  воды зависят линейно от числа метиленовых групп в структуре аминокислоты. На основе обнаруженной аддитивности вкладов в релаксацию ядер растворителя построена модель водного окружения  $\omega$ -аминокислот. Квантово-химические расчеты и экспериментальные данные ЯМР согласованно показывают, что гидратное окружение группы  $\text{CH}_2$  содержит 7 молекул воды. Времена корреляции вращательного движения молекул воды вблизи гидрофобной метиленовой группы в 1,5-2 раза длиннее, чем у



- объемной воды, в температурном диапазоне от 2 до 75°C. Времена корреляции вращательного движения молекул воды в гидратных оболочках гидрофильных групп немного длиннее, чем в объемной воде при температурах выше 60°C, но при более низких температурах они составляют 0,8 ÷ 1,0 от значений времени корреляции для объемной воды.
2. Показано, что обработка белков с помощью H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, моделирующая окислительный стресс, приводит к образованию межмолекулярных дисульфидных мостиков через аминокислоту цистеин на поверхности. Что, в свою очередь, приводит к масштабным структурным изменениям. Это становится исходной точкой для процессов агрегации и дестабилизации структуры, что повышает уязвимость белка к протеолитическому расщеплению. На основе данных ЯМР по H/D обмену и рефолдингу белковой цепи, а также компьютерного моделирования МД, показало, что дисульфид-связанные агрегаты (димеры и олигомеры) перешедшие в развернутое состояние под действием большой тепловой флуктуации, обладают низкой способностью к рефолдингу. Это приводит к постепенному переходу белка от нативного состояния к разупорядоченному.
  3. Разработан новый ЯМР-эксперимент на базе <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N HSQC для определения скоростей H/D обмена в агрегатных частицах белков, формирующихся при окислительном стрессе. Данные по H/D обмену, отслеженному с помощью этого метода на <sup>15</sup>N-меченных образцах белка RRM2, в согласии с другими вспомогательными биофизическими методами показывают, что (i) дисульфид-связанные димеры утрачивают способность длительное время сохранять стабильную структуру и способность к правильному рефолдингу и по этой причине могут служить зародышем для агрегации белков, (ii) формируемые агрегатные частицы включают в себя не только димеры и олигомеры, но и мономеры, (iii) между фракцией растворимых мономеров и агрегированным белком происходит обмен за счет обменной реакции тиол-дисульфид.
  4. Разработана новая методика для моделирования функции распределения белковых агрегатных частиц по размерам, основанная на совместном анализе данных измерений диффузии с помощью ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля и данных динамического рассеяния света. Ее апробация на примере домена RRM2 белка TDP-43 показала, что размеры агрегатных частиц распределены по экспоненциальному закону.
  5. Температурная зависимость скоростей спиновой релаксации ядер <sup>15</sup>N, включая релаксацию, обусловленную кросс-корреляцией между дипольным взаимодействием и анизотропией химического сдвига, для нативно-разупорядоченных белков на примере N-концевого хвоста гистона H4 показала, что динамические процессы в этом белке имеют характерные времена

корреляции от 100 пс до 1 нс при комнатной температуре. Моделирование методом молекулярной динамики скоростей ЯМР релаксации показало, что модель воды TIP4P-D обеспечивает наилучшее согласие расчетов с экспериментом. На основе траектории МД с водой TIP4P-D выявлены моды движения, которые вносят наибольший вклад в ЯМР релаксацию  $^{15}\text{N}$ : скачкообразные изменения двугранных углов основной цепи белка вызывают релаксацию, как в гибкой, так и в более структурированной части разупорядоченных белков, однако для гибкой части существенный вклад составляют колебания этих углов, чего не наблюдается для структурированной части.

### **ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

Основные результаты работы отражены в 6 публикациях в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science и Scopus:

- A1. Rabdano S.O. и др. Onset of disorder and protein aggregation due to oxidation-induced intermolecular disulfide bonds: case study of RRM2 domain from TDP-43 // *Scientific Reports*. 2017. Т. 7, № 1. С. 11161.
- A2. Rabdano S.O. и др. “Hydration Shells” of  $\text{CH}_2$  Groups of  $\omega$ -Amino Acids as Studied by Deuteron NMR Relaxation // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2015. Т. 119, № 42. С. 13358–13366.
- A3. Rabdano S.O. и др. Loss of Protein Stability due to Formation of Intermolecular Disulfide Bonds under the Effect of Oxidative Stress: Case Study of the RRM2 Domain from Neuropathological Protein TDP-43 // *Biophysical Journal*. 2016. Т. 110, № 3. С. 210a.
- A4. Rabdano S. и др. Characterizing the size of protein aggregate particles using a combination of NMR diffusion measurements and dynamic light scattering: case study of RRM2 domain from protein TDP-43 // *The FEBS Journal*. 2017. Т. 284 (Suppl. 1). С. 212.
- A5. Kaempf K., Rabdano S.O. и др. Local and global dynamics of intrinsically disordered proteins: a case study of H4 histone tail // *The FEBS Journal*. 2017. Т. 284 (Suppl. 1). С. 95.
- A6. Luzik D.A., Rabdano S.O., Skrynnikov N.R. Non-native disulfide bridges in protein-peptide complex and in protein homodimers trigger unfolding and aggregation // *The FEBS Journal*. 2017. Т. 284 (Suppl. 1). С. 212.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Mizuno K., Oda K., Shindo Y., Okumura A. O-17- and H-1-NMR studies of the water structure in binary aqueous mixtures of halogenated organic compounds // *Journal of Physical Chemistry*. – 1996. – Т. 100, № 24. – С. 10310-10315.
2. Halle B. Protein hydration dynamics in solution: a critical survey // *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*. – 2004. – Т. 359, № 1448. – С. 1207-1223.

3. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiological Reviews*. – 2002. – T. 82, № 1. – C. 47-95.
4. Offermann M. K., McKay M. J., Marsh M. W., Bond J. S. Glutathione disulfide inactivates, destabilizes, and enhances proteolytic susceptibility of fructose-1,6-bisphosphate aldolase // *Journal of Biological Chemistry*. – 1984. – T. 259, № 14. – C. 8886-8891.
5. Fisher M. T., Stadtman E. R. Oxidative modification of Escherichia Coli glutamine synthetase: decreases in the thermodynamic stability of protein structure and specific changes in the active site conformation // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – T. 267, № 3. – C. 1872-1880.
6. Furukawa Y., Fu R. G., Deng H. X., Siddique T., O'Halloran T. V. Disulfide cross-linked protein represents a significant fraction of ALS-associated Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in spinal cords of model mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – T. 103, № 18. – C. 7148-7153.
7. Karch C. M., Prudencio M., Winkler D. D., Hart P. J., Borchelt D. R. Role of mutant SOD1 disulfide oxidation and aggregation in the pathogenesis of familial ALS // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – T. 106, № 19. – C. 7774-7779.
8. Cohen T. J., Hwang A. W., Unger T., Trojanowski J. Q., Lee V. M. Y. Redox signalling directly regulates TDP-43 via cysteine oxidation and disulphide cross-linking // *EMBO Journal*. – 2012. – T. 31, № 5. – C. 1241-1252.
9. Salomone S., Caraci F., Leggio G. M., Fedotova J., Drago F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2012. – T. 73, № 4. – C. 504-517.
10. Dunker A. K., Silman I., Uversky V. N., Sussman J. L. Function and structure of inherently disordered proteins // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2008. – T. 18, № 6. – C. 756-764.
11. Ward J. J., Sodhi J. S., McGuffin L. J., Buxton B. F., Jones D. T. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life // *Journal of Molecular Biology*. – 2004. – T. 337, № 3. – C. 635-645.
12. Brown C. J., Johnson A. K., Dunker A. K., Daughdrill G. W. Evolution and disorder // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2011. – T. 21, № 3. – C. 441-446.
13. Rezaei-Ghaleh N., Giller K., Becker S., Zweckstetter M. Effect of Zinc Binding on beta-Amyloid Structure and Dynamics: Implications for A beta Aggregation // *Biophysical Journal*. – 2011. – T. 101, № 5. – C. 1202-1211.
14. Norris E. H., Giasson B. I., Lee V. M. Y.  $\alpha$ -Synuclein: Normal Function and Role in Neurodegenerative Diseases // *Current Topics in Developmental Biology* Academic Press, 2004. – C. 17-54.
15. Tyuryaeva I. I., Lyublinskaya O. G., Podkorytov I. S., Skrynnikov N. R. Origin of anti-tumor activity of the cysteine-containing GO peptides and further optimization of their cytotoxic properties // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7. – C. 40217.
16. Chizhik V. I. NMR relaxation and microstructure of aqueous electrolyte solutions // *Molecular Physics*. – 1997. – T. 90, № 4. – C. 653-659.
17. Schanda P., Van Melckebeke H., Brutscher B. Speeding up three-dimensional protein NMR experiments to a few minutes // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – T. 128, № 28. – C. 9042-9043.