

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Рабдано С. О. «Развитие методов ЯМР для исследования состояния биологических молекул в условиях окислительно-восстановительных процессов» представленной на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

В работе соискателя предложены подходы на основе ЯМР спектроскопии для белков в агрегированном состоянии при наблюдении спектров глобулярной формы белка сделать выводы о степени разупорядочивания пептидных цепей в агрегированном состоянии. Предложен метод определения параметров распределения частиц по размерам в полидисперсной системе агрегатных частиц.

При рассмотрении гидратной оболочки аминокислот как суперпозиции гидратных оболочек отдельных молекулярных групп и квантово-химических расчетов водного окружения соискателем были определены характерные времена переориентационного движения молекул воды.

Соискателем были измерены времена ЯМР релаксации ^{15}N в нативно разупорядоченных белка и для интерпретации данных выполнено моделирование МД. Это позволило выявить основные моды молекулярного движения, ответственные за процесс ЯМР релаксации в подобных системах.

Автор использует метод ЯМР и ряд других вспомогательных биофизических методов для изучения систем, включающих в себя аминокислоты и белки.

В результате, было установлено, что при низких концентрациях аминокислот в D_2O скорости ЯМР релаксации ядер ^2H воды зависят линейно от числа метиленовых групп в структуре аминокислоты. На основе обнаруженной аддитивности вкладов в релаксацию ядер растворителя была построена модель водного окружения ω -аминокислот. Квантово-химические расчеты и экспериментальные данные ЯМР согласованно показывают, что гидратное окружение группы CH_2 содержит 7 молекул воды.

Автором было определено, что 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 $0,8 \div 1,0$ от значений времени корреляции для объемной воды.

В работе было выявлено, что обработка белков с помощью H_2O_2 , моделирующая окислительный стресс, приводит к образованию межмолекулярных дисульфидных мостиков через аминокислоту цистеин на поверхности. Это приводит к масштабным структурным изменениям и становится исходной точкой для процессов агрегации и дестабилизации структуры. При этом 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. В этом, (как показано автором диссертации) причина постепенного перехода белка от нативного состояния к разупорядоченному.

Автором был предложен ЯМР-эксперимент на базе $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ 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 ^{15}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.

На основе температурной зависимости скоростей спиновой релаксации ядер ^{15}N , включая релаксацию, обусловленную кросс-корреляцией между дипольным взаимодействием и анизотропией химического сдвига, для нативно-разупорядоченных белков на примере N-концевого хвоста гистона H4 соискателем было показано, что динамические процессы в этом белке имеют характерные времена корреляции от 100 пс до 1 нс при комнатной температуре. Далее на основе моделирования методом молекулярной динамики скоростей ЯМР релаксации автором было показано, 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}N : скачкообразные изменения двугранных углов основной цепи белка вызывают релаксацию,

как в гибкой, так и в более структурированной части разупорядоченных белков.

В целом, диссертационная работа Рабдано С. О. «Развитие методов ЯМР для исследования состояния биологических молекул в условиях окислительно-восстановительных процессов» представленная на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная задача по дальнейшему развитию методов ЯМР в исследовании состояния биологических молекул в условиях окислительно-восстановительных процессов.

Считаю, что по актуальности, новизне результатов и их практической ценности работа диссертационная работа Рабдано С. О. соответствует требованиям, предъявляемым п. 9 Положения о присуждении ученых степеней ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 — физика магнитных явлений, а её автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Главный научный сотрудник лаборатории прецизионной физики и метрологии простых атомных систем (лаборатория № 2023),
Федеральное государственное унитарное предприятие
"Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д.И. Менделеева" {ФГУП "ВНИИМ им. Д.И. Менделеева"}.
190005, Россия, Санкт-Петербург, Московский пр., 19.
телефон: +7 812 251-76-01; E-mail: yineronov@yandex.ru
Доктор физико-математических наук, профессор

 Неронов Юрий Ильич

