

Севастьян О.О.

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Севастьяна Олеговича Рабдано «РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ЯМР ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 – физика магнитных явлений.

Мир биологических молекул чрезвычайно разнообразен, поэтому для исследования структуры биологических макромолекул привлекают целый арсенал инструментальных методов. Метод ЯМР относится к числу наиболее информативных методов установления пространственной структуры биомолекул в жидкой фазе. Однако спектральное разрешение метода ограничено в случае наблюдения высокомолекулярных структур, агрегатов, протеин-липидных комплексов и т.п. В этих случаях приходится разрабатывать новые методические подходы косвенного наблюдения взаимодействия электромагнитных полей на частотах резонанса ядер биомолекул, которые дают исчерпывающую информацию о взаимном расположении атомов в молекуле и их динамическом состоянии. Поэтому представленную диссертацию Рабдано С.О., посвященную исследованию этих вопросов на нескольких ярких примерах молекул нативно разупорядоченных белков можно считать вполне актуальной и соответствующей требованиям п. 4 специальности 01.04.11 – физика магнитных явлений.

Поставленная цель работы - развитие методов ЯМР для исследования состояния биомолекул – решается диссертантом последовательно через разработку трех самостоятельных методических разделов:

- Методика релаксационных измерений ядер дейтронов воды в гидратных оболочках аминокислот
- Исследование релаксации ядер  $^{15}\text{N}$  нативно разупорядоченных белков в однородном магнитном поле высокой напряженности
- Исследование релаксационного поведения молекул белков при переходе из глобулярного к развернутому и затем агрегированному состоянию в процессе обратимого окисления, индуцируемого перекисью водорода.

### Структура и содержание представленной диссертационной работы

Диссертационная работа изложена по классическому канону введения, трех глав, общего заключения, списка сокращений и списка литературы. Каждая глава в отдельности сопровождается отдельным литературным обзором и самостоятельным заключением. Введение суммирует актуальность, новизну, цели и основные положения работы выносимые на защиту. Работа изложена на 134 страницах, включая 35 рисунков, 2 таблицы и список литературы из 175 наименований.

**Первая глава** посвящена вопросам исследования методом ЯМР релаксации ядер дейтерия гидратации аминокислот, определения гидратных чисел из концентрационных и температурных зависимостей времен релаксации. Времена корреляции вращательного движения  $\text{D}_2\text{O}$  в гидратной оболочке метиленовой группы оказались почти в 2 раза длиннее, чем в чистой дейтерированной воде. Этот результат представляет самостоятельную ценность для теории структуры воды и гидрофобных эффектов. Значения координационных чисел молекулярных групп были определены в ходе квантово-химических расчетов и их значения совпали с числами, определяемыми по изломам концентрационных зависимостей скоростей релаксации. К сожалению, обсуждение этих интересных данных проведено без учета сведений о влиянии дейтерия на прочность водородной связи Н-Н и отличие структуры простой и тяжелой воды.

**Вторая глава** целиком посвящена рассмотрению вопросов возможности метода ЯМР в варианте использования эффектов релаксации ядер за счет кросс-корреляций анизотропии химического сдвига и диполь-дипольных взаимодействий, измерения коэффициентов диффузии в градиенте магнитного поля для детального изучения молекулярного движения, агрегации при формировании дисульфидных связей домена RRM2 изотопно меченого белка TDP-43. Обращено внимание на способ выделения вкладов процессов агрегации белка и собственно обмена протонов на дейтерий. Методом спектроскопии  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC вместе с биофизическими методами и методами протеомики доказано образование дисульфид-связанных димеров, которые являются центрами последующей агрегации белковых частиц. Показано, что агломераты пептидных цепей стабилизированы не только дисульфидными связями, но и дополнительными нековалентными взаимодействиями. Сделаны оценки времен жизни порядка нескольких микросекунд дисульфид-связанных димеров RRM2 и показано, что в дальнейшем отдельные димеры разворачиваются и образуют бесформенные агрегаты. При проведении реакции восстановления происходит разрушение агрегатов и частичный рефолдинг белка. Следует отметить, что вопросы фолдинга-рефолдинга белков находятся на острие внимания молекулярных биологов и потому эти данные представляют несомненный практический интерес для построения фундаментальной теории кооперативных процессов биомакромолекул.

Совместное применение метода измерения диффузии белков в градиенте магнитного поля и динамического рассеяния света позволило диссертанту расширить диапазон оценки эффективного гидродинамического радиуса частиц от мономеров до крупных агрегатов. Оригинальный способ математического моделирования функции размерного распределения дисперсии позволил показать для агрегатов белка RRM2 выполнение экспоненциального закона.

**Третья заключительная глава** описывает разработанные автором ЯМР эксперименты по оценке интенсивности молекулярного движения отдельных групп нативно разупорядоченных белков, интерпретация которых проводится с помощью компьютерного моделирования с учетом участия молекул воды в гидратных оболочках аминокислотных групп. В рабочей модели молекулярного движения обращено особое внимание на колебания двугранных углов основной пептидной цепи, которое доходит до крайних значений резких поворотов- скачков двугранных углов наподобие flip-flop. Генерацией траекторий угловых координат отдельных пептидных групп в методе молекулярной динамики удалось провести сравнительный анализ времен релаксации ядер  $^{15}\text{N}$  вдоль цепи и выявить основные моды движения, которые дают наибольший вклад в релаксацию азота. Сделан нетривиальный вывод о том, что механизм релаксации  $^{15}\text{N}$  обязан колебаниям двугранных углов безотносительно к жесткости основной пептидной цепи. Для гибкой части белка скачкообразные переходы углов более характерны по сравнению со структурированными частями. Следует отметить репрезентативный характер представленных выводов на рисунках экспериментальных и расчетных скоростей магнитной релаксации ядер  $^{15}\text{N}$ . К возможному улучшению формы представления результата можно предложить прямой пересчет времен релаксации во времена корреляции переориентационного движения межядерного вектора  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  на осях ординат рис.3.4-3.6.

**Научная новизна результатов диссертационной работы** выражается в предлагаемых оригинальных рекомендациях по найденным и обоснованным конкретным протоколам ЯМР экспериментов, адаптированных к конкретным объектам исследования биологической природы, а именно, нативно неупорядоченных белков и их агрегатов, индуцированных окислительным стрессом. Предложен алгоритм совместного анализа

релаксационных данных вместе с квантово-химическими расчетами. Получены новые данные о молекулярной динамике актуальных для нейропатологии белков на основании анализа механизма релаксация ядер  $^{15}\text{N}$  в магнитном поле протонов окружающих аминокрупп. В качестве нового результата можно также считать данные о размерном распределении агрегатов белков, полученных из данных потери фазовой памяти спинов в импульсных градиентах поля и сопоставляемых с результатами квазиупругого рассеяния света. Способ совместного использования оптических данных и спинового эха отличается оригинальностью интерпретации.

#### **Достоверность результатов и обоснованность выводов**

Достоверность экспериментальных результатов метода ЯМР обеспечена использованием валидированных образцов растворов белков, подробным убедительным описанием способов их получения генно-инженерными методами, применением реактивов высокой степени очистки. Дополнительным фактором достоверности данных является высокий уровень культуры съемки спектров в разнообразных стандартных режимах (HSQC, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, NH(CO)CACB, HNCO, HN(CA)CO) на спектрометре с рабочей частотой 500 МГц с отстроенным датчиком тройного резонанса. Отрадно отметить факт поддержания высокой точности установки температуры в датчике прибора ЯМР, оцениваемой по смещению откалиброванного сигнала метанола.

Качество расчетов молекулярной динамики выбранных моделей проверено путем анализа доступных литературных данных и обсуждением их точек расхождений за счет отличий моделей.

Обоснованность выводов обеспечена подробным анализом, непротиворечивостью логики формулирования выводов и максимально возможным сравнением с данными инструментальных методов, базирующихся на принципах отличных от ЯМР.

#### **Практическое значение полученных в диссертации результатов**

Предложенная автором методология может быть рекомендована для оценки гидратных чисел короткоцепных пептидов, содержащих аминокруппы с резко отличной степенью гидрофобности. Методический подход к изучению молекулярных процессов с начальных стадий димеризации и последующей агрегации в условиях окислительного стресса может быть расширен в область мембрана ассоциированных низкомолекулярных белков, в том числе, белков электрон-транспортной цепи. Последнее вытекает из результатов внимательного изучения поведения S-S связи в условиях переменного редокс-состояния. Предложенные методические варианты исследования нативно неупорядоченных белков в условиях окислительного стресса можно рассматривать как инструмент для изучения явления фолдинга – рефолдинга многих физиологически активных белков, играющих важную роль в патогенезе тканей. Результаты диссертационной работы могут быть включены в содержание лекционных курсов по способам спектрального изучения белков.

#### **Замечания по тексту диссертационной работы**

Основное замечание к содержательной части работ сводится к недостаточно-полному обоснованию выбора для демонстрации новых методов ЯМР биологических объектов: домена RRM2 белка TDP-43 и хвостовой части гистона H4. Из текста видно, что диссертант обладал счастливой возможностью исследовать данные биомолекулы в силу доступности препаратов в его лаборатории. Было бы логичнее излагать материал в обратной логике исходя из требований разработанных методик ЯМР. Понимание этого обстоятельства было бы облегчено перечислением требований к исследуемой молекуле для демонстрации новых методических подходов как-то - наличие сульфидных связей, пределы возможной по спектральной чувствительности молекулярной массы, какие

аминогруппы должны входить в остов молекулы и в каком чередовании, избирательность вхождения атомов  $^{15}\text{N}$  в конкретные участки пептидной цепи и тому подобное. Такое изложение облегчило бы понимание универсальности или ограничений выбранных диссертантом методических подходов. Для оценки практического применения методов было бы неплохо привести возможный список молекул-кандидатов.

Результаты исследования гидратации омега-аминокислот, суммированные в заключении главы 1 на стр.33, получены путем исследования температурных и концентрационных зависимостей времен релаксации ядер дейтерия тяжелой воды. Получены интересные данные относительно координационных чисел  $\text{CN}_2$  групп и времена корреляции молекулярного движения. Все данные получены для растворов с большим содержанием изотопа дейтерия. Известно, что тяжелая вода оказывает специфическое воздействие на биологические молекулы и организмы в целом. В тексте отсутствует обсуждение этого важного обстоятельства, которое может повлиять на правомочность переноса выводов на протонированную воду.

На стр.41 описан способ определения доли мономеров в агрегатных частицах RRM2. Оценка доли мономеров производится по величине интегральной интенсивности линий резонанса C-концевого хвоста. Повышенная подвижность обеспечивает визуализацию линии в спектре, однако известно, что измеряемая реальная интенсивность линии может зависеть не только от числа резонирующих ядер, но и от времени спин-спиновой релаксации. Неясно как производился учет этого фактора.

Фраза на стр.50 «димеры и тримеры RRM2 достаточно малы, чтобы произвести узкие спектральные сигналы ЯМР. Тем не менее, эти частицы оказываются неупорядоченными и сильно неоднородными» стилистически небрежна и затрудняет понимание смысла текста.

Непонятно, почему в неупорядоченных димерах и тримерах RRM2 отсутствует динамическое усреднение конформаций, которое делает невозможным их наблюдение с помощью спектроскопии высокого разрешения?

Есть погрешности в стиле изложения грамматического свойства как, например, «относительно мало работ» с.5, «подталкивает к выводу» с.24, «значение координационного числа зависит от способа, которым оно было определено» с.27, «иерархии типов молекулярного движения» с.87, «нормальный гомеостаз» с.88, «скорости релаксации показывают хорошо известный профиль» с.97.

### **Заключение по диссертационной работе**

Диссертационная работа Севастьяна Олеговича Рабдано «РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ЯМР ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ» является завершенной научно-квалификационной работой по специальности физика магнитных явлений. Работа является вкладом в развитие методических подходов в области магнитного резонанса ядер  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ . с выраженным акцентом на релаксационные явления сложных объектов биологического происхождения с неупорядоченной внутренней структурой. Работа выполнена на должном научном уровне качества измерения спектров и времен ядерной магнитной релаксации, результаты которых грамотно интерпретированы в технике компьютерного моделирования (молекулярная динамика, квантово-химическое моделирование). Полученные результаты на примерах домена белка RRM2 и остатка гистона H4 обоснованы и достоверны. Отмеченные в отзыве замечания являются в основном следствием недостаточной редакторской проработки текста и в принципе не влияют на итоговое положительное восприятие диссертации.

Автореферат диссертации полно отражает содержание диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы опубликованы в 6 статьях международных рецензируемых научных журналов с высоким импакт-фактором, апробированы на представительных международных конференциях по магнитному резонансу с публикацией 18 тезисов.

Считаю, что по актуальности, новизне результатов и их практической ценности работа Севастьяна Олеговича Рабдано соответствует требованиям, предъявляемым п.9 Положения о присуждении ученых степеней ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических по специальности 01.04.11 - физика магнитных явлений.

Начальник лаборатории, старший научный сотрудник  
ФГУП ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, лаборатория  
медицинских нанотехнологий

Кандидат физико-математических наук (молекулярная физика)  
197110, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д.7, ГосНИИ ОЧБ  
+7(921)642 13 29  
nikolaevhpb@gmail.com



Николаев Борис Петрович

Подпись ФИО заверяю



*Кренишевская О.Г. 07.05.2018*  
*направлением*  
*администрирования*