

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 212.232.44 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»,
ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ,
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 20 июня 2018 № 10

О присуждении Рабдано Севастьяну Олеговичу, гражданину РФ, ученой степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Развитие методов ЯМР для исследования состояния биологических молекул в условиях окислительно-восстановительных процессов» на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 — «физика магнитных явлений», принята к защите 3 апреля 2018 года, протокол № 6, диссертационным советом, созданным на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Правительство Российской Федерации, 199034, Санкт Петербург, Университетская набережная, д. 7-9. Диссертационный совет учрежден приказом Минобрнауки РФ № 75/нк от 15 февраля 2013 г.

Соискатель Рабдано Севастьян Олегович, 1991 года рождения, в 2014 году окончил физический факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет». В 2018 году продолжает обучаться в очной аспирантуре при СПбГУ по специальности 01.04.11 — «физика магнитных явлений».

Диссертация выполнена в лаборатории биомолекулярного ЯМР и на кафедре ядерно-физических методов исследования физического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Правительство РФ.

Научный руководитель — PhD, Скрынников Николай Русланович, работает в должности руководителя лаборатории биомолекулярного ЯМР ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет».

Официальные оппоненты:

1. Польшаков Владимир Иванович, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, факультет фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;
 2. Николаев Борис Петрович, кандидат физико-математических наук, начальник лаборатории, старший научный сотрудник, лаборатория медицинских нанотехнологий, ФГУП ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России;
- дали положительный отзыв на диссертацию.

Ведущая организация — ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина, в своем положительном заключении, составленном кандидатом физико-математических наук, ученым секретарем Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ Константином Александровичем Шабалиным, обсужденном и принятом на заседании ученого совета Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ (протокол № 98 от 18 апреля 2018 г.), утвержденном руководителем Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, кандидатом физико-математических наук Андреем Леонидовичем Коневега, указала, что диссертация Рабдано С.О. посвящена развитию методов ЯМР для изучения биологических систем в состояниях, неподдающихся прямому наблюдению с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Разработка методик ЯМР для получения информации о структуре и динамике в гидратном окружении аминокислот связано с перспективой исчерпывающего описания кинетических процессов, определяющих взаимодействия между биомолекулами. В свою очередь, изучение процесса ЯМР релаксации ядер ^{15}N в нативно разупорядоченных белках нацелено на разделение и понимание мод динамики в сложном многообразии конформационных превращений для белковых молекул. И наконец предлагаемая методология ЯМР, основанная на спектроскопии HSQC и продемонстрированная на протеинопатическом белке TDP-43, для изучения агрегатных частиц может быть применена для получения ценной информации о тельцах включения,

являющихся отличительным признаком многих нейродегенеративных заболеваний. Диссертация является законченным научным исследованием и полностью соответствует требованиям ВАК Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Публикации по теме диссертационной работы полностью отражают ее содержание. Результаты работы обладают высокой научной актуальностью, новизной и потенциально имеют значительную практическую значимость. Рабдано С.О. заслуживает присвоения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 — «физика магнитных явлений».

Соискатель имеет 24 публикации по теме диссертации, из которых 6 в рецензируемых международных научных журналах, 18 в трудах международных конференций. Основные результаты работы отражены в следующих публикациях:

- [1] Rabdano S. O., Izmailov S. A., Luzik D. A., Groves A., Podkorytov I. S., Skrynnikov N. R. 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.
- [2] Rabdano S. O., Donets A. V., Vovk M. A., Michel D., Chizhik, V. I. “Hydration Shells” of CH₂ Groups of ω-Amino Acids as Studied by Deuteron NMR Relaxation // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2015. Т. 119, № 42. С. 13358–13366.
- [3] Rabdano S. O., Podkorytov I. S., Izmailov S. A., Pivovarova Y. V., Yakimov A. P., Yuwen T., Groves A., Skrynnikov, N. R. 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.
- [4] Rabdano S., Podkorytov I., Luzik D., Skrynnikov N. 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.
- [5] Kaempfer K., Rabdano S. O., Izmailov S. A., Groves A., Podkorytov I. S., Skrynnikov, N. R. 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.
- [6] 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.

На автореферат диссертации поступили 4 отзыва.

1. От кандидата химических наук Бородкина Геннадия Сергеевича, главного научного сотрудника НИИ физической и органической химии Южного федерального университета и доктора химических наук Черныша Юрия Ефимовича, ведущего научного сотрудника НИИ физической и органической химии Южного федерального университета. Отзыв положительный. Отмечается, что в работе предлагаются методики ЯМР для изучения структуры и динамики молекул воды в гидратном окружении отдельных молекулярных групп аминокислот, а также разрабатываются новые методики ЯМР и подходы к интерпретации данных ЯМР для изучения глобулярных и развернутых белков. В работе широко используется метод моделирования молекулярной динамики. К недостаткам можно отнести излишне затянутое описание актуальности темы исследования в автореферате, с другой стороны эксперимент по H/D обмену недостаточно хорошо снабжен пояснениями о том, как определяется скорость обмена амидных протонов белка с растворителем. С указанным замечанием соискатель согласился.

2. От доктора физико-математических наук, профессора Неронова Юрия Ильича, главного научного сотрудника лаборатории прецизионной физики и метрологии простых атомных систем ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д.И. Менделеева». Отзыв положительный. В нем отмечается, что предложены подходы на основе ЯМР спектроскопии для белков в агрегированном состоянии при наблюдении спектров глобулярной формы белка. 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 белках и для интерпретации данных выполнено моделирование МД. Это позволило выявить основные моды молекулярного движения, ответственные за процесс ЯМР релаксации в подобных системах. Автор развивает и использует методики ЯМР и ряд других вспомогательных биофизических методов для изучения систем, включающих в себя аминокислоты и белки. Замечаний нет.

3. От доктора физико-математических наук, член-корр. АНРТ, профессора Тагирова Мурата Салиховича, заведующего кафедрой квантовой электроники и радиоспектроскопии Института Физики Казанского (Приволжского) федерального университета. Отзыв положительный. В отзыве отмечается, что новизна работы

заключается в разработке нового подхода к совместному анализу данных ЯМР релаксации и квантово-химических расчетов, который в итоге позволил описать водное окружение органических молекул в виде системы, в которую входят гидратные оболочки отдельных гидрофильных и гидрофобных молекулярных групп. В отзыве к недостаткам относятся стилистические неточности, использование жаргонных выражений и частое отсутствие раскрытия сокращений. Диссертант согласился с указанными замечаниями.

4. От доктора химических наук, профессора Воронова Владимира Кирилловича, профессора кафедры информатики Иркутского национального исследовательского технического университета. Отзыв положительный. Замечаний нет.

Во всех отзывах отмечается, что представленная работа полностью отвечает требованиям к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 — «физика магнитных явлений».

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что Польшаков Владимир Иванович и Николаев Борис Петрович имеют печатные работы, соответствующие тематике диссертационной работы, и являются признанными специалистами в этой области. Выбор ведущей организации обоснован широкой известностью и длинной историей достижений в данной отрасли науки, а также наличием высококвалифицированных специалистов в области магнитного резонанса в Отделении молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, которые обладают соответствующей компетенцией и способны провести объективную оценку научной и практической ценности диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- 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.

- 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.

- На основе данных ЯМР по H/D обмену и рефолдингу, а также результатов 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.

- 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.

- 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.

Теоретическая и практическая значимость исследования обоснована тем, что:

- 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 посттрансляционным 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 и опробован для успешного уничтожения раковых в лаборатории биомолекулярного ЯМР СПбГУ;

- разносторонняя характеристика систем, подобных изученному домену RRM2 из белка TDP-43, является существенным вкладом в понимание нейропатологических процессов, вызванных окислительным стрессом;

- анализ спиновой релаксации ядер ^{15}N в нативно разупорядоченном белке и ее сравнение с существующими моделями показали, что в современной литературе представлено неполное описание мод движения, отвечающих за ЯМР релаксацию.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что в работе используется ряд 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.

Личный вклад автора состоит в разработке протоколов экспериментов, выполнении экспериментов, численных расчетах, обработке данных и большей части компьютерного моделирования. Основные результаты и выводы диссертации сформулированы лично автором. Полученные оригинальные результаты стали основой ряда публикаций в соавторстве с научным руководителем и другими коллегами. В подавляющем большинстве выступлений на конференциях по теме диссертации автор был основным докладчиком.

Диссертация характеризуется целостностью и внутренним единством, последовательностью и обоснованностью сделанных выводов. Диссертация представляет собой научно-квалификационную работу высокого уровня и соответствует критериям, установленным пунктами 9 – 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. № 723; 21.04.2016 г. № 335)

На заседании 20 июня 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Рабдано Севастьяну Олеговичу ученую степень кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 — «физика магнитных явлений», протокол № 10.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 13 человек, из них 6 докторов наук по специальности 01.04.11 — «физика магнитных явлений», участвовавших в заседании, из 19 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за — 13, против — 0, недействительных бюллетеней — 0.

Председатель

Диссертационного совета Д212.232.44

д.ф.-м.н.



Зернов

Зернов Н.Н.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д212.232.44

к.ф.-м.н.

Комолкин

Комолкин А.В.

22.06.2018г.