

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Шенкарева Захара Олеговича «Структурно-функциональное состояние мембранных белков и мембраноактивных пептидов по данным ЯМР-спектроскопии», представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Диссертация посвящена одной из наиболее трудных для экспериментального исследования тем в изучении структуры молекул, – структуре мембранных белков и пептидов в составе мембран. Получение структуры даже для водорастворимых нативных белков представляет собой сложную задачу, но сложность увеличивается многократно при исследовании комплексов мембрана – белок для всех структурных методов, в том числе и для ЯМР высокого разрешения, выбранного диссертантом в качестве основного структурного метода. Сложность заключается в том, что мембрана должна обеспечить растворимость, конформацию и динамику для исследуемого белка или пептида, но не должна мешать, своим присутствием, наблюдать за ними. В идеале надо сделать ее невидимой и бестелесной. Именно это и является самым трудным. Автор и его коллеги проделали огромную работу, чтобы получить замечательные структурные результаты.

Наиболее простыми средами для сольubilизации и получения структурных данных являются изотропные среды, – органические растворители, однако они не могут создать условий существования белка, подобных мембранным, хотя и дают некоторое представление о том, что может быть в мембране. Еще более близкие к мембранным условиям дают анизотропные среды, существующие в воде в виде везикул и мицелл, что является очень хорошим приближением к условиям мембранной анизотропии. Однако, они имеют ограничения как из-за свойств, не полностью моделирующих мембраны, так и из-за больших размеров, маскирующих изучаемые объекты. Диссертанту и его коллегам удалось получить наиболее точно моделирующие свойства мембран липид-белковые нанодиски, отвечающие требованиям ЯМР-спектроскопии, встроить туда интересующие их объекты и получить уникальную структурную информацию.

Актуальность данной работы очевидна. Мембранные белки участвуют во множестве важных процессов жизнедеятельности клетки, таких как рецепция, передача сигналов, молекулярный и ионный транспорт через мембрану и многих других. Даже небольшие изменения структуры этих белков нередко критичны для их функционирования. Исследование структуры и динамики мембранных белков и пептидов, а также установление

связи между структурой, динамикой и функцией этих молекул является одной из интереснейших задач современной биофизики. Структурные исследования этих объектов важны и для решения прикладных задач биотехнологии, фармакологии и медицины, в том числе для разработки новых лекарственных препаратов. Особенно актуальным это является в наше время, когда возможности создания новых антибиотиков кажутся ограниченными перед проблемой возникновения новых резистентных возбудителей опасных болезней.

Одним из наиболее мощных методов структурного анализа является ЯМР-спектроскопия высокого разрешения, позволяющая получать не только пространственную структуру крупных биологических молекул, но и их внутримолекулярную динамику, что является чрезвычайно важным в понимании их функционирования. В настоящее время ЯМР-спектроскопия оказалась практически единственным методом, позволяющим получать экспериментальные данные по внутримолекулярной динамике и пространственной структуре белков и пептидов, которые не поддаются кристаллизации, в том числе и гидрофобных или амфифильных пептидных молекул.

Диссертация состоит из: оглавления, списка сокращений, введения, семи глав, выводов и списка цитируемой литературы, и занимает 351 страницу, сюда же входит 108 рисунков и 17 таблиц. Список литературы включает в себя 540 источников. Введение кратко описывает актуальность, цели и задачи, новизну и значимость данной работы.

Обзор литературы написан на 76 страницах, включает 21 рисунок и 3 таблицы. Содержит в себе сведения о силах и взаимодействиях, которые стабилизируют структуры мембранных белков и пептидов. Кратко, но достаточно широко описан метод ядерного магнитного резонанса высокого разрешения и его многочисленные параметры. Этого, наверное, достаточно, чтобы неспециалисту в области ЯМР понять специальную терминологию, использованную в работе. Далее показаны возможности ЯМР в исследовании мембранных белков и пептидов. Очень хорошо описываются возможности применения различных изотропных и анизотропных мембраномоделирующих сред. Достаточно подробно описываются липид-белковые нанодиски, как альтернативная мембраномоделирующая среда, имеющая несравненно больше сходства с клеточными мембранами. Довольно подробно описаны антимикробные мембраноактивные пептиды, их структура, свойства, механизмы действия. Финальная часть обзора посвящена информации о структурной организации и молекулярных механизмах работы потенциалозависимых K^+ -каналов, полученной не только ЯМР, но и другими структурными методами. Описываются модели потенциалозависимой активации. В целом обзор написан очень хорошо, много ценной информации, сведенной воедино и только той, что в дальнейшем понадобится

автору для обсуждения своих результатов. Его можно рекомендовать студентам и аспирантам, специализирующимся в этой области в качестве вводного курса.

Вторая глава, – «Липид-белковые нанодиски – альтернативная среда для стабилизации «нативной» структуры и ЯМР-исследований мембранных белков и мембраноактивных пептидов», содержит 26 страниц текста, 13 рисунков и 3 таблицы.

Целая глава посвящена очень важному вопросу о получении наиболее адекватной модели природных мембран, применимой в спектроскопии ЯМР. Внимание автора и его коллег было обращено на реконструированные незрелые частицы липопротеинов высокой плотности или липид-белковые нанодиски. Они состоят из фрагмента бислойной мембраны, окруженного димером аполипопротеина или специального белка MSP (membrane scaffold protein), – синтетического аналога аполипопротеина. Согласно современным представлениям эти объекты имеют форму диска толщиной ~ 4 нм, совпадающей с толщиной биологической мембраны. Различные аполипопротеины и белки MSP позволяют формировать нанодиски диаметром от 6 до 20. Фрагмент липидной мембраны такого нанодиска сохраняет многие биофизические свойства настоящих бислойных систем, например, в нанодисках наблюдается хорошо выраженный фазовый переход липидов из гелевого в жидкокристаллическое состояние. По сравнению с классическими мембранными миметиками, мицеллами и небольшими сферическими бицеллами, традиционно применяемыми в ЯМР-спектроскопии, нанодиски характеризуются рядом уникальных свойств. Они более стабильны, а фрагмент плоской бислойной мембраны в их составе гораздо лучше моделирует биологическую мембрану, чем сферическая динамически подвижная поверхность бицеллы/мицеллы. Нанодиски в отличие от липидных везикул характеризуются меньшими размерами, что значительно расширяет спектр экспериментальных методик, которые могут быть применены для исследования встроенных белков. Препараты, основанные на нанодисках, легко поддаются смене буфера, могут быть сконцентрированы или разбавлены. Кроме того, интегральные мембранные белки, встроенные в нанодиски, оказываются защищенными от нежелательных межмолекулярных взаимодействий, что обеспечивает стабильность белковых препаратов в течение длительного времени. Это является очень важным для получения необходимого набора данных из длительных ЯМР-экспериментов.

В результате этой работы впервые теоретически и экспериментально была показана возможность применения нанодисков для ЯМР-исследований интегральных мембранных белков. Был предложен новый метод ренатурации (фолдинга *in vitro*) политопных и субъединичных спиральных мембранных белков, основанный на сборке комплексов белок/нанодиск напрямую из денатурированного состояния мембранного белка из раствора

жестких детергентов. Оказалось, что эффективность процесса ренатурации зависит от свойств липидных молекул, используемых для формирования нанодисков (заряд полярных головок, степень насыщенности жирнокислотных цепей). Общий выход рефолдинга в основном определяется эффективностью встраивания мембранных белков в нанодиски.

На примере двух модельных водорастворимых β -структурных пептидов ареницина-2 и НТII была исследована возможность применения нанодисков для изучения специфических взаимодействий пептид/мембрана и механизмов «мембранного катализа» в функционировании мембраноактивных антимикробных пептидов и нейропептидов, а также для исследования энергетики, стехиометрии и топологии взаимодействия мембраноактивных нейротоксинов с липидной мембраной.

Основным недостатком предлагаемой среды являются сравнительно большие размеры мембраномоделирующих комплексов, что ограничивает ее применение для ЯМР-исследований, хотя, по мнению диссертанта, существуют пути решения этой проблемы, заключающиеся в создании методами биоинженерии новых белков MSP, позволяющих формировать нанодиски меньшего диаметра.

Третья глава «Исследование антибиотических пептидов, содержащих внутримолекулярные циклы» занимает 65 страниц, содержит 27 рисунков, 6 таблиц и представляет собой последовательное изложение экспериментальных данных, полученных, в основном, методами ЯМР-спектроскопии, их обсуждение и предполагаемые модели взаимодействия исследуемых объектов с мембранами.

В частности, определена первичная и пространственная структура нового двухкомпонентного лантибиотика лихеницидина Lch α /Lch β , и предложен возможный механизм его антимикробной активности (ингибирует рост многих грамм-положительных бактерий). В данном исследовании были использованы классические мембраномоделирующие изотропные среды: метанол, смеси метанол/вода и метанол/хлороформ, что позволило детально охарактеризовать конформационную гетерогенность молекул Lch α /Lch β , обусловленную «медленными» (по шкале времен ЯМР) динамическими процессами. Наличие консервативных внутримолекулярных циклов, образованных тиоэфирными связями, говорит о важности ковалентных взаимодействий для биологической активности лантибиотиков. В то же время высокая внутримолекулярная подвижность пептида Lch α , позволяющая изменять взаимную ориентацию двух рецепторных доменов, соединенных гибким шарнирным участком, может играть важную роль в антибиотическом действии лихеницидина.

Определена пространственная структура и энергетика образования тройных комплексов циклотиды (KB1/KB7)×(мицелла DPC)×(двухвалентный катион Mn²⁺) в

классических анизотропных мембраномоделирующих средах, – мицеллах детергентов, с использованием парамагнитных меток. Это позволило подтвердить наличие в молекулах циклотидов особой топологии дисульфидных связей, так называемого «цистеинового узла», которая придает необычайную жесткость пространственной структуре. Автор приходит к естественному, на мой взгляд, заключению, вытекающему из анализа представленных данных, о том, что основную роль в стабилизации пространственной структуры циклотидов играют внутримолекулярные взаимодействия, а за образование комплекса пептид/мембрана в основном ответственны неспецифические гидрофобные взаимодействия. Кроме того, важную роль в биологической активности этих объектов играет связывание двухвалентных катионов за счет специфических электростатических взаимодействий. Эти выводы подтверждены в более поздних работах ряда зарубежных авторов.

Методами гетероядерной ^1H , ^{13}C , ^{15}N -ЯМР-спектроскопии определена пространственная структура ареницина-2 (проявляет активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов), в водном растворе и классических анизотропных мембраномоделирующих средах: мицеллах детергентов и липид-детергентных бицеллах. Охарактеризована динамика основной цепи пептида, что позволило отследить изменения, возникающие при взаимодействии ареницина с мембраноподобным окружением. Совместный анализ полученных структурных данных, данных КД-спектроскопии и результатов электрофизиологических исследований позволил смоделировать возможный тип взаимодействия ареницина с липидными мембранами и предложить механизм антимикробной активности пептида, опосредованный его мембранной активностью.

В работе впервые определена пространственная структура высокого разрешения димера β -шпильки ареницина-2 в мембраноподобном окружении. Кроме того, впервые показано, что конформация и динамика β -структурных антимикробных пептидов, стабилизированных дисульфидными связями, может значительно меняться при взаимодействии с мембраной. В то же время, дисульфидная связь в молекуле пептида важна, как для формирования конформации β -шпильки, так и для мембранной и биологической активности.

Автор указывает также на примере этого исследования на необходимость тщательного анализа результатов, полученных в мицеллярных средах. Высокодинамичные мицеллы детергентов, вероятно, способны удовлетворительно моделировать гидрофобную составляющую взаимодействия пептид/мембрана, но использование детергентов различного заряда для моделирования электростатической компоненты этого взаимодействия может приводить к недостоверным результатам.

Методами гетероядерной ^1H , ^{15}N -ЯМР-спектроскопии определена пространственная структура и динамика основной цепи аурелина – антимикробного пептида в водном растворе. Определена энергетика взаимодействия аурелина с липосомами различного липидного состава. Используя мицеллы DPC в качестве мембраномоделирующего окружения, определена возможная топология взаимодействия аурелина с липидной мембраной. Предполагается, что, пространственная структура аурелина определяется внутримолекулярными взаимодействиями (включая дисульфидные связи), а за образование комплекса пептид/мембрана, видимо, отвечают электростатические взаимодействия с полярными головками липидов. Для этого пептида рассмотрен также механизм взаимодействия с поровым доменом K^+ -каналов. Совмещение биологических свойств антимикробного пептида и токсина-блокатора в одной пептидной молекуле, описанное в данной работе для аурелина, не является уникальным.

Четвертая глава посвящена исследованию линейных каналобразующих антибиотиков Aam-I и Zrv-IIВ, изложена на 65 страницах, содержит 25 рисунков и 2 таблицы. Aam-I и Zrv-IIВ – пептаиболы – уникальные антибиотические пептиды, продуцируемые некоторыми почвенными полупаразитическими грибами.

Результаты, полученные в ходе исследований пептаиболов, выявляют основные принципы, использованные природой при конструировании спиральных антимикробных пептидов, действующих на мембраны клеток, а также механизмы формирования ионных каналов этими пептидами.

Исследование структуры и динамики Zrv-IIВ в различных средах, моделирующих биологическую мембрану, показало, что пептид, независимо от свойств мембраномоделирующего окружения, формирует правозакрученную спираль, которая имеет достаточную «жесткость», для того, чтобы пронизывать гидрофобную часть мембраны и образовывать трансмембранные ионные каналы из связок спиралей. Стабильность спирали Zrv-IIВ усиливает биологическую активность пептида.

Исследование структуры и динамики другого пептида – Aam-I показало, что пептид, независимо от свойств мембраномоделирующего окружения, обладает конформационными флуктуациями в мкс-мс диапазоне времен, и эти обменные процессы вызваны переходами между правозакрученной и левозакрученной спиральной конформацией у ахиральных и α,α -диалкилированных остатков (Aib, D-Iva и Gly). Вероятно, именно эти структурно-динамические свойства Aam-I ответственны за его низкую биологическую и каналобразующую активности.

Сопоставляя результаты исследования Aam-I/Zrv-IIВ и ареницина-2, автор выдвигает вполне естественное предположение, что конформационная подвижность

представляет собой дополнительное свойство, которое наряду с другими факторами (гидрофобность, амфифильность, заряд) определяет мембранную активность пептидов и на порядок ослабляет антибиотическую активности Aam-I по сравнению с гомологичным, но «стабильным» пептидом Zgv-ПВ. Здесь убедительно показано также, что для спиральных пептидов, не обладающих зарядом, основным детерминантом мембранной активности являются гидрофобные взаимодействия. Именно эти взаимодействия определяют топологию комплекса пептид-мембрана и обуславливают переход молекул пептида в трансмембранное состояние в «тонких» мембранах, где толщина гидрофобного слоя меньше или равна гидрофобной длине спирали пептида. Этот важный вывод был сделан благодаря использованию автором «тонких» нанодисков на основе «короткоцепочечных» фосфолипидов (diC12:0).

Следует еще раз подчеркнуть, что результаты только этого исследования, несомненно, будут полезны при дизайне новых или модификации природных антибиотических агентов, – задаче, которая приобрела особую важность в последнее время в связи с распространением патогенных микроорганизмов, резистентных к “классическим” антибиотикам.

Пятая глава, «Исследование потенциалочувствительного домена канала KvAP», занимает объем 42 страницы, включая 22 рисунка и 1 таблицу, посвящена изучению структуры и динамики крупного (148 а.о. 17.3 кДа) мембранного белка – потенциал-чувствительного домена калиевого канала KvAP (*VSD-KvAP*).

Результаты, изложенные в этом разделе, явились первым успешным примером использования нанодисков для исследования политопного мембранного белка методом ЯМР-спектроскопии. Несмотря на то, что в проведенных исследованиях нанодиски играли лишь вспомогательную роль, метод скрининга мембранных миметиков, предложенный в этом разделе, основанный на сравнительном анализе 2D ^1H , ^{15}N -спектров в детергент-содержащих средах и нанодисках, показал, что структурные характеристики *VSD-KvAP* в том и другом – сходны. Поскольку большинство ЯМР экспериментов трудно выполнимы с применением нанодисков, удачный выбор мицелл позволяет наиболее точно воспроизвести присутствие мембраны. Таким образом, была охарактеризована вторичная и третичная структура, а также внутримолекулярная динамика *VSD-KvAP* в окружении мицелл. Наблюдаемая структурная организация объекта, содержащего большие полости, заполненные растворителем, согласуется с концепцией «сфокусированного электрического поля». Она предполагает, что основное падение трансмембранного потенциала происходит на небольшом участке в середине молекулы *VSD-KvAP*, длина которого значительно

меньше толщины бислоя. Именно через этот участок и осуществляется перенос 4-х элементарных положительных зарядов в ходе потенциалозависимой активации.

Движения спиралей домена относительно друг друга, наблюдаемые в мкс-мс диапазоне времен, отражают конформационную лабильность, свойственную структуре домена. Возможно, такие движения являются прообразом высокоамплитудных конформационных перестроек, происходящих в домене при изменении трансмембранного потенциала. Полученные динамические данные согласуются с некоторыми известными моделями перехода из состояния покоя в активированное состояние для описания потенциалозависимой активации канала KvAP.

Меня состав мицелл, автор обнаружил, что структура *VSD-KvAP* может немного изменяться, представляя «расплавленное» или «предсвернутое» состояние, напоминающее состояние «расплавленной глобулы» водорастворимых белков. В «расплавленном» состоянии сохраняется компактная упаковка домена и до некоторой степени взаимная ориентация трансмембранных спиралей. Это состояние заметно отличается от денатурированного состояния, наблюдаемого в жестких детергентах. Автор показывает, что внутримолекулярные электростатические взаимодействия и двумерная упаковка липидного бислоя играют важную роль в стабилизации «нативной» структуры мембранного белка и подчеркивает, что ЯМР-спектры хорошего качества не всегда соответствуют «нативной» конформации мембранных белков.

В этом разделе получен еще один интересный результат: показано взаимодействие на структурном уровне *VSD-KvAP* и β -структурного токсина VSTx1 (34 а.о., 4010 Да), ингибирующего потенциалозависимую активацию канала KvAP и некоторых других калиевых каналов путем специфического взаимодействия с потенциалочувствительными доменами. Было показано, что пространственная структура токсина, в основном, стабилизирована внутримолекулярными взаимодействиями, а за образование комплекса пептид/мембрана ответственны как электростатические, так и гидрофобные взаимодействия с липидами. При этом электростатические взаимодействия играют основную роль. Взаимодействие *VSD-KvAP/VSTx1* во многом определяется начальным связыванием пептида с мембраной или миметиком мембраны. Встраивание в интерфейсный регион липидного бислоя придает токсину ориентацию, необходимую для эффективного взаимодействия с потенциал-чувствительным доменом и позволяет образовать комплекс со спиральными участками белка (S1-S2), погруженными в мембрану. При этом молекула токсина, образуя солевые связи со спиралью S3b, блокирует ее движения, ингибируя работу канала. В этом случае не требуется прямого контакта между молекулой токсина и «датчиком потенциала», – спиралью S4, ковалентно связанной с S3b.

Эти результаты существенно меняют устоявшееся мнение о механизме действия «вольт-сенсорных» токсинов, в рамках которого постулируется, что основной сайт связывания токсинов локализован на «потенциалочувствительной лопасти» и, в частности, на спирали S4 потенциал-чувствительного домена.

Шестая глава короткая, – 6 страниц, и представляет собой заключение – общее обсуждение всех полученных результатов.

Седьмая глава – «Экспериментальная часть (Материалы и методы исследований)» описывает все операции, связанные с получением, очисткой, идентификацией объектов исследования, а также методы их исследования: получение и анализ экспериментальных результатов, математическая обработка и еще очень много всего, что может оказаться полезным для исследователей.

Представленная работа описывает громадный экспериментальный материал, полученный автором в содружестве с его коллегами по лаборатории и институту. Даже, практически, простое перечисление наиболее интересных, на мой взгляд, результатов занимает не малый объем для отзыва. В работе содержится масса остроумных находок, тонких замечаний и предостережений, полезных для специалистов. Следует указать на лидирующее положение этого исследовательского коллектива и лично диссертанта в области изучения структурной организации мембранных белков не только в нашей стране, но и за рубежом.

Диссертация написана очень хорошо, после каждого раздела следует резюме, со сжатым изложением полученного результата и его места в общей системе знаний по данному предмету. Тем не менее при чтении испытываешь трудности из-за чрезмерного количества введенных сокращений. Вполне понимая, для чего это сделано, выражаю свое мнение. Есть несколько незначительных замечаний, или скорее вопросов. На стр. 19 автореферата (стр. 167 диссертации): $pH \sim 5/7$?. Стр. 229: сравниваются две близкие величины 21,5 Å и 23,1 Å, но без представленной погрешности (вряд ли она менее 10%), эти значения почти одинаковы? То же на стр. 271: сравниваются 31 Å и 32 Å ? Стр. 305: при учете селективной T1, почему шкалированы вверх именно на 20%? Стр. 307: задержки на эволюцию КССВ ${}^3\text{H}_{\text{NC}}$ (τ_j) составляли 133 или 139.4 мс, из- за учета температуры? Стр. 313: что такое насыщение на мощности 125Гц? Стр. 314: Что такое нелинейное вписывание спектров в программе?

Диссертационная работа Шенкарева Захара Олеговича, безусловно, является серьезным, законченным, научным трудом, выполненном на высочайшем экспериментальном и теоретическом уровне. Получены уникальные результаты и показаны перспективы дальнейшего успешного продвижения в столь трудной теме исследования.

Основные положения диссертации отражены в публикациях автора и в автореферате, который полностью соответствует диссертации. По своей актуальности и новизне представленного материала, уровню изложения, а также по его теоретическому и практическому значению диссертационная работа удовлетворяет всем требованиям ВАК, а ее автор, Захар Олегович Шенкарев, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент, заведующий лабораторией ЯМР-исследований биосистем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН)

Доктор ф.-м. н., профессор



Кутышенко В.П.

15 октября 2014 г.



Кутышенко В.П.
Груздева

Сведения об оппоненте

Кутышенко Виктор Павлович

доктор физико-математических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика»

Основное место работы:

Заведующий Лабораторией ЯМР-исследований биосистем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пушкино

Основные публикации по теме диссертации

- [1]. A.Yu. Budantsev, V. N. Uversky, V.P. Kutysenko. Analysis of the Metabolites in Apical Area of Allium Cepa Roots by High Resolution NMR Spectroscopy Method. *Protein & Peptide Letters*, 2010, **17**, 86-91.
- [2]. В. С. Христофоров, Д. А. Прохоров, М. А. Тимченко, Ю. А. Кудреватых, Л. В. Гущина, В. В. Филимонов, В. П. Кутышенко. ЯМР-исследование структуры и динамики химерного белка SH3-D семейства «SH3-Бержерак». *Биоорганическая химия*. 2010. Т. **36**. С. 505-513.
- [3]. В.П. Кутышенко, Л.В. Гущина, В.С. Христофоров, Д.А. Прохоров, М.А. Тимченко, Ю.А. Кудреватых, Д.В. Федюкина, В.В. Филимонов. Структура и динамика химерного белка SH3 F2 по данным ЯМР. *Мол. Биология*. 2010, том **44**, № 6, с. 1–11.
- [4]. B.S. Melnik, N.V. Molochkov, D.A. Prokhorov, V.N. Uversky, V.P. Kutysenko. Molecular mechanisms of the anomalous thermal aggregation of green fluorescent protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2011, **1814**, p.1930-1939.
- [5]. V.P. Kutysenko, M. Molchanov, P. Beskaravayny, V.N. Uversky, M.A. Timchenko. Analyzing and mapping Sweat Metabolomics by High-resolution NMR Spectroscopy *PLoS one*, 2011, v. **6**, issue 12, e28824
- [6]. М. В. Молчанов, В. П. Кутышенко, А. Ю. Буданцев, Г. Р. Иваницкий. От фрагментов к морфогенезу: ЯМР-спектроскопия метаболитов в апексе корней лука. *ДАН*. 2012. Т. **442**, № 6, с. 828-832.
- [7]. S.G. Guryanov , V. V. Filimonov, A. A. Timchenko, B. S. Melnik, H. Kihara, V.P. Kutysenko, L.P. Ovchinnikov, G.V. Semisotnov The major mRNP protein YB-1: structural and association properties in solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, (2013), **1834**, pp. 559-567
- [8]. V.P. Kutysenko, P.M. Beskaravayny, M.V. Molchanov, S.I. Paskevich, D.A. Prokhorov,, V.N. Uversky. Looking at microbial metabolism by high-resolution 2H-NMR spectroscopy. (2013) *PeerJ* **1:e101**; DOI 10.7717/peerj.101
- [9]. V.P. Kutysenko, D.A. Prokhorov, N.V. Molochkov, M. G. Sharapov, I.Kolesnikov, V. N. Uversky. Dancing retro: solution structure and micelle interactions of the retro-SH3-domain, retro-SHH-‘Bergerac’. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2014; **32(2):257-72**
- [10]. L.V. Basova , E.I. Tiktopulo, V.P. Kutysenko, S.I. Klenin, V.A. Balobanov, V.E. Bychkova. Membrane-induced changes in the holomyoglobin tertiary structure: interplay with function. *Eur Biophys J*. 2014 v. **4**, pp. 317–329

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Шенкарева Захара Олеговича «Структурно-функциональное состояние мембранных белков и мембраноактивных пептидов по данным ЯМР-спектроскопии», представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика

Актуальность темы.

Мембраны клеток являются одними из основных компонентов, участвующих и определяющих основные процессы живой системы, включающие транспорт питательных соединений, передачу сигнала, генерацию энергии и т.д. Основными компонентами мембран являются липиды и белки, последние составляют примерно треть всех белков клеток. Однако структуры и механизм функционирования этих белков, их взаимодействия с липидной фазой мембраны в настоящее время остаются плохо изученными.

Работа З.О.Шенкарева посвящена детальному изучению структуры, внутренней динамики и взаимодействию мембранных белков и пептидов с мембранами и мембраномоделирующими средами методом ЯМР-спектроскопия высокого разрешения, которая позволяет изучать пространственную структуру и внутримолекулярную динамику МБ в мембраноподобном окружении. Данный метод позволяет не только определить пространственную структуру мембранных белков и пептидов, но и оценить их молекулярную динамику в мембранном окружении. Поэтому актуальность диссертационной работы З.О.Шенкарева «Структурно-функциональное состояние мембранных белков и мембраноактивных пептидов по данным ЯМР-спектроскопии» не вызывает сомнений.

Достоверность и новизна результатов и выводов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием широкого набора современных методов ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, использования разнообразных сред для моделирования мембранного окружения белков и пептидов, методов молекулярного моделирования, детального сопоставления своих экспериментальных данных и полученных другими данными, активное использование

информации о пространственных структур мембранных белков, полученных методом рентгеноструктурного анализа.

Ценность для науки и практики.

Основная значимость работы лежит в теоретической плоскости. В работе были определены пространственные структуры ряда пептидов, изучено их взаимодействие с мембранами, установлены силы, определяющие эти взаимодействия, оценена роль динамики белков в связывании с мембраной. Особо следует отметить обоснование возможности применения нанодисков для ЯМР исследований, предложен оригинальный метод рефолдинга мембранных белков с использованием этих нанодисков. Тем не менее, результаты работы могут иметь и практическую ценность для разработки новых пептидных антибиотиков, механизм действия которых обусловлен нарушением целостности мембраны. Такие антимикробные агенты вызывают повышенный интерес в связи с тем, что клетки с большим трудом могут выработать устойчивость для них.

Оценка содержания.

Диссертационная работа З.О.Шенкарева построена по традиционному плану и включает следующие разделы и главы: введение, обзор литературы, методы, результаты, Заключение (Обсуждение результатов) и выводы. Объем работы составляет 351 страниц, включая 108 рисунков и 17 таблиц.

Введение написано в достаточно четкой и полной форме, знакомит читателя с существом проблемы, ставит цель и формулирует основные задачи работы.

Обзор литературы (Глава 1) состоит из шести разделов, изложен на 72 страницах и посвящен детальному описанию основного использованного метода и объектам исследования. В начале обзора проведен анализ сил, определяющих стабильность пространственных структур мембранных белков и пептидов, и их взаимодействий с мембранами. В следующем разделе дается краткое описание метода ЯМР-спектроскопии высокого разрешения и регистрируемых параметров, используемых для анализа структуры белков и их взаимодействий. Отдельный раздел посвящен использованию ЯМР-спектроскопии в исследовании мембранных белков. Четвертый раздел описывает новую мембран-моделирующую среду липид-белковые нанодиски. Последние два раздела освящают основные объекты последующих

исследований – антимикробные мембраноактивные пептиды (раздел 5) и катионные мембранные каналы (раздел 6). Обзор литературы производит цельное впечатление, подробно вводит в основные темы исследования, что значительно облегчает последующий анализ работы.

Часть «*Результаты*» включает четыре главы, в которых приведены собственные результаты автора и их сопоставление с экспериментальными данными и теоретическими расчетами других исследователей. В начале автор теоретически обосновывает, а потом показывает в экспериментальных исследованиях возможность использования липид-белковых нанодисков для исследования мембранных белков и пептидов и их взаимодействия с липидной фазой методом ЯМР-спектроскопии. Показано, что нанодиски обладают рядом существенных преимуществ, по сравнению с традиционно используемыми в ЯМР исследованиях мембраномоделирующими средами. Показана возможность применения нанодисков для корректного фолдинга интегральных мембранных белков *in vitro*. Далее приведены исследования автора по определению методом ЯМР пространственных структур мембраноактивных пептидов, имеющих жесткую структуру, стабилизированную внутримолекулярными ковалентными связями (глава 3), и спиральных антимикробных пептидов (глава 4). Было показано, что жесткая структура необходима для проявления мембранной активности пептидов, но изменение локальной конформации пептида играет важную роль в его эффективности взаимодействия с мембраной, а ряде случаев может определять его селективность. На основе ЯМР экспериментов были предсказаны положения пептидов относительно поверхности мембран, модели формирования мембранных каналов этими пептидами. В главе 5 описаны результаты исследования потенциалочувствительного домена канала KvAP. Были изучено изменение пространственной структуры домена в зависимости от мембраномоделирующей среды и показано, что в ряде сред этот мембранный белок может находиться в «расплавленном» состоянии, аналогично тому, что было ранее показано для водорастворимых белков. Приведены данные о структуре и динамики «нативного» состояния этого домена, перехода из «расплавленного» состояния в нативную конформацию и предложена модель на атомарном уровне активации потенциалочувствительного домена канала KvAP трансмембранным потенциалом. В заключительной части главы приводятся результаты исследования взаимодействия токсина паукообразных с этим доменом. Показано, что первоначально токсин связывается с мембраной и в этом предориентированном состоянии уже связывается с

белком. При этом связывание происходит не с «потенциалчувствительной» спиралью домена, а с соседней, т.е. можно говорить об аллостерическом ингибировании канала KvAP токсином VSTx1. В ходе описания полученных результатов автором неоднократно было отмечено, что в ряде случаев использование традиционных мембраномоделирующих сред может привести к некорректным выводам, и для получения наиболее адекватных результатов необходимо использовать модели с максимально приближенными свойствами с природной мембраной. В данной работе для этого были использованы липид-белковые нанодиски. Это представляется мне наиболее интересной и важной частью данной работы.

В части *«Заключение. Обсуждение результатов»* (глава 6) кратко очерчены основные результаты, подчеркнуто, что во взаимодействии мембранных пептидов в зависимости от их состава ведущую роль могут играть не только гидрофобные взаимодействия, но и электростатические силы. Встраивание в мембрану является эндотермическим процессом, ведущую роль в котором играет энтропия. Отмечена важная роль внутримолекулярной динамики как пептидов при их взаимодействии с мембраной, так и для функционирования мембранных белков. Отмечена важная роль в выборе адекватной модели мембраны для установления нативной структуры мембранных белков и пептидов и для исследования их поведения. По мнению автора лучшими характеристиками среди мембраномоделирующих сред на сегодняшний день обладают липид-белковые нанодиски.

В части *«Экспериментальная часть (Материалы и методы исследований)»* (Глава 7), состоящем из 8 разделов, описаны характеристики белков и пептидов, использованных в работе (с указанием, где они были получены); методы создания нанодисков и анализа их характеристик; методы кругового дихроизма; использования метода ЯМР-спектроскопии для структурных исследований и расчета динамических характеристик; анализ эффекта парамагнитного усиления, релаксации и межмолекулярного ЯЭО; определение энергетических параметров образования комплексов и фолдинга мембранных белков; методы молекулярного моделирования. Арсенал методов, используемых в работе разнообразен и адекватен поставленным задачам.

Выводы работы достаточно хорошо сформулированы и в полной мере соответствуют задачам, поставленным в работе.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.

Основные результаты диссертации опубликованы в 63 публикациях, в том числе 23 статьи в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах, 1 глава в книге и 3 патента. Автореферат полностью отражает основные положения диссертации.

Положительно оценивая работу в целом, следует отметить ряд недостатков в работе:

1. На мой взгляд основным достижением в данной работе является исследование влияния мембраномоделирующих сред для изучения структуры и поведения в мембране мембранных пептидов и белков и доказательство применимости использования липид-белковых нанодисков для этих целей. В то же время эти данные разбросаны по всей диссертации, что затрудняет их анализ. Хотелось бы, чтобы в главе «Обсуждение результатов» было бы не только краткое перечисление результатов проделанной работы, но и более детальный анализ применимости различных мембраномоделирующих сред для различных исследований, выявление их преимуществ и ограничений.
2. Утверждается, что для исследований желательно использовать нанодиски минимального размера, поскольку это необходимо для получения хороших ЯМР сигналов. Но даже для нанодисков, использованных в работе, встает вопрос о влиянии белка, окружающего нанодиск, на поведение белка в таких дисках. Диаметр липидной фазы в таких нанодисках должен составлять примерно 8 нм, тогда как такой небольшой фрагмент мембранного белка как потенциалочувствительный домен канала KvAP уже имеет размеры 2x3 нм и с учетом латеральной диффузии в липидной фазе должен активно контактировать с MSP. Соотношение физических размеров липидной фазы и размера исследуемого белка уже могут накладывать ограничения на использования нанодисков в таких исследованиях. На мой взгляд данные вопросы недостаточно освещены в работе.

Сделанные замечания не является принципиальным, и не снижают положительной оценки работы.

Заключение: По актуальности проблемы, методическому уровню, объему и новизне полученных результатов, их фундаментальной и научно-практической значимости диссертация Шенкарева Захара Олеговича «Структурно-функциональное состояние мембранных белков и мембраноактивных пептидов по данным ЯМР-спектроскопии», представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям п.9 положения «О порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Шенкарев Захар Олегович, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора физико-математических наук по специальности Биофизика.

28.10.2014

Заведующий лабораторией
Структурной биоинформатики,
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича»
д.б.н.



А.В.Веселовский

119121, г. Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

Тел. +7-499-245-07-68

veselov@ibmh.msk.su

Подпись Веселовский
заверяю
Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карпова



Сведения об оппоненте

Веселовский Александр Владимирович

доктор биологических наук по специальности 03.00.04 – «биохимия»

Основное место работы:

Заведующий Лабораторией структурной биоинформатики Федерального государственного бюджетного учреждения Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, г. Москва

Основные публикации по теме диссертации

- [1]. А.В.Веселовский, Б.Н.Соболев, М.С.Жаркова, А.И.Арчаков. Компьютерные методы предсказания субстратной специфичности цитохромов р450. *Биомедицинская химия*, 2010. Т. **56**. № 1. С. 90-100.
- [2]. Kaluzhny D, Ilyinsky N, Shchekotikhin A, Sinkevich Y, Tsvetkov PO, Tsvetkov V, Veselovsky A, Livshits M, Borisova O, Shtil A, Shchyolkina A. Disordering of human telomeric g-quadruplex with novel antiproliferative anthrathiophenedione. // *PLoS One*. 2011. **6**. **11**. e27151
- [3]. Zharkova M.S., Sobolev B.N., Oparina N.Yu., Veselovsky A.V., Archakov A. I. Prediction of amino acid residues participated in substrate recognition by cytochrome P450 subfamilies with broad substrate specificity. *J.Mol.Recogn.* 2013. V. **26**. N 1. P. 86-91.
- [4]. Stulov S.V., Mankevich O.V., Novikov R.A., Tkachev YV., Timofeev V.P., Dugin N.O., Pozdnev V.F., Fedyushkina I.V., Scherbinin D.S., Veselovsky A.V., Misharin AYu. Synthesis and molecular modeling of (4'R)- and (4'S)- 4'-substituted 2'-{[(E)-androst-5-en-17-ylidene]-methyl}oxazolines. // *Steroids*. 2013. **78**. 521–527.
- [5]. Федюшкина И.В., Стулов С.В., Дугин Н.О., Мишарин А.Ю., Мехтиев А.Р., Морозевич Г.Е., Веселовский А.В. Молекулярное моделирование взаимодействия 17(20) и 17(20)E-прегна-5,17(20)-диен-21-оиламидов с ядерным рецептором LXRb. // *Биомедицинская химия*, 2013, Т. **59**, № 3, С. 321-329.
- [6]. Щербинин Д.С., Веселовский А.В. Исследование механизма взаимодействия тромбин-связывающего аптамера с тромбином и претромбином-2 методом молекулярной динамики. // *БИОФИЗИКА*, 2013, Т. **58**, № 3, С. 415–424.
- [7]. Sobolev B.N., Veselovskii A.V., Poroikov V.V. Prediction of posttranslational modifications in proteins: trends and methods, *RUSS CHEM REV.*, 2014, Vol. **83** (2), p. 143-154.

- [8]. Хайруллина В.Р., Таипов И.А., Веселовский А.В., Щербинин Д.С., Герчиков А.Я. Новые ингибиторы каталитической активности 5-липоксигеназы на основе производных 2-(3-метилфенил)пропановой кислоты и 4-замещенного морфолина. // *БИОХИМИЯ*, 2014, том **79**, вып. 4, с. 476 – 484.
- [9]. Veselovsky A.V., Zharkova M.S., Poroikov V.V., Nicklaus M.C. Computer-aided design and discovery of protein–protein interaction inhibitors as agents for anti-HIV therapy. // *SAR and QSAR in Environmental Research*, 2014, Vol. **25**, No. 6, 457–471.

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию ШЕНКАРЕВА ЗАХАРА ОЛЕГОВИЧА «СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И МЕМБРАНОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ ПО ДАННЫМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ», представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Поскольку я давно занимаюсь химией липидов и веду исследования по применению наноразмерных частиц, содержащих липидные молекулы, в качестве носителя лекарственных препаратов, работа Шенкарева Захара Олеговича представляла для меня несомненный интерес. В этой работе подобные частицы (липосомы, мицеллы, бицеллы, а также нанодиски) были использованы в качестве модели биологической мембраны для исследования белковых и пептидных молекул методами ЯМР-спектроскопии в растворе.

Исследование мембранных белков и пептидов, а также работы по созданию новых наноразмерных систем, позволяющих стабилизировать гидрофобные молекулы в растворе являются весьма актуальными задачами современной фундаментальной и прикладной науки. Во-первых, определение структурной организации белков и выяснение вопроса о том, с какими структурно-динамическими изменениями связано их функционирование, является одной из ключевых проблем современной биофизики. Хотя основным методом структурной биологии в настоящее время является рентгеноструктурный анализ, ЯМР-спектроскопия фактически незаменима при исследовании молекул, не поддающихся кристаллизации, а также при необходимости получения информации о динамике белков и механизмах конформационных переходов. Именно изучению таких объектов и процессов, недоступных для исследования другими методами, и посвящена диссертация Шенкарева З.О. Так, широко известны трудности, возникающие при кристаллизации мембранных белков и пептидов в отсутствие мембранного окружения, а также большая конформационная подвижность этих молекул. Все эти обстоятельства делают работу Шенкарева З.О., в которой проведено исследование структуры и динамики ряда антимикробных пептидов и отдельного вольт-сенсорного домена K^+ -канала KvAP, важных для биологических и медицинских приложений, в высшей степени актуальной.

Во-вторых, разработка методов инкапсуляции мембранных белков, и других гидрофобных молекул в наноразмерные липид-содержащие частицы, для сохранения их активности в растворе, является одной из ключевых проблем современной биотехнологии и медицины. Наличие подобных стабильных препаратов мембранных рецепторов, позволяет ставить задачи по высокоэффективному скринингу прототипов лекарств. Кроме того,

наноразмерные носители необходимы для доставки в различные ткани организма, химиотерапевтических препаратов, многие из которых плохо растворимы. То, что в диссертации Шенкарева З.О. большое внимание посвящено развитию новой технологии липид-белковых нанодисков и ее применению в новых областях (ЯМР-спектроскопия, бесклеточный синтез белков, ренатурация белков) придает дополнительную актуальность представленной работе.

Диссертация изложена на 351 странице и построена по традиционному плану. Она состоит из введения, семи глав, включая заключение, выводов и списка литературы, содержащего ссылки на 540 источников. Следует отметить, что диссертация довольно хорошо структурирована, после каждого логически обособленного фрагмента (глава, подглава) следует «резюме», в котором в нескольких абзацах текста суммируются основные полученные результаты.

Сравнительно большая глава 1 (76 страниц) начинается с введения, посвященного описанию взаимодействий стабилизирующих структуру мембранных биомолекул. Это введение необходимо для понимания поставленных задач и результатов, полученных в работе. В основной части главы приведен обзор литературы по пяти темам. Первые две из них посвящены изложению основ метода ЯМР-спектроскопии в применении к исследованиям мембранных белков и пептидов. Автору удалось в простой для понимания и в тоже время содержательной форме осветить современное состояние в этой области науки и показать круг нерешенных проблем. Основной акцент сделан на различных способах моделирования мембранного окружения в ЯМР исследованиях. Описаны свойства широко применяемых «мембраномоделирующих» частиц, включая мицеллы, бицеллы и липосомы. Три последние части главы 1 посвящены описанию новых мембраномоделирующих частиц – нанодисков, их структуре, методах получения, и использования, а также современному состоянию науки в области изучения антибиотических пептидов, действующих на мембраны, и потенциал-зависимых K^+ каналов. Эти части литературного обзора необходимы для понимания проблематики исследований проведенных в работе, которые сосредоточены вокруг трех основных объектов/тем: липид-белковых нанодисков, антибиотических пептидов и K^+ каналов.

Вторая, по моему мнению, самая важная и в тоже время краткая (27 страниц) глава посвящена разработке новых методов применения технологии нанодисков. В этой главе на примере двух белков K^+ канала KcsA и мембранного домена рецептора ErbB3 человека, а также нескольких мембраноактивных пептидов впервые показана возможность использования нанодисков для ЯМР исследований мембранных биомолекул. Как оказалось, несмотря на свои сравнительно большие размеры (молекулярная масса более 100 кДа),

нанодиски могут использоваться для получения структурной и динамической информации методами ЯМР высокого разрешения. Приоритет автора в этой области подтвержден публикациями в высокорейтинговых зарубежных (две статьи в *J.Am.Chem.Soc* 2008 и 2010 гг.) и российских (статьи в журнале *Биохимия* 2009 г. и *Acta Naturae* 2014 г) изданиях. Следует отметить, что эти работы были выполнены в условиях жесткой конкуренции, первые результаты зарубежных исследователей были получены всего лишь на год позже (статьи Gluck et al и Raschle et al опубликованные в 2009 г в *J.Am.Chem.Soc*). Введение новой среды для ЯМР позволило автору получить ряд уникальных результатов при изучении антибиотических пептидов и домена K^+ канала.

В главе 2 также приводится описанию новых методов использования нанодисков для рекомбинантной продукции мембранных белков. Эти методы важны, так как именно отсутствие универсальных систем продукции мембранных белков с «правильной» пространственной структурой, затрудняет их исследование и применение. В ходе проведенной работы, автором была рассмотрена перспективная возможность применения нанодисков в системах бесклеточной продукции мембранных белков, а также предложен метод ренатурации рекомбинантных белков с использованием нанодисков и аполипопротеинов. На двух модельных объектах, имеющих существенно разное строение и функции (канал *KcsA* и бактериородопсин *ESR*) автором была продемонстрирована возможность практически количественного фолдинга мембранных белков в мембранах нанодисков. Однако, наблюдаемая зависимость эффективности процесса фолдинга от структуры липидов формирующих нанодиск, показывает, что предложенный подход не является универсальным и требует тщательной оптимизации липидного состава для различных белков. Несмотря на это я считаю, что предложенный метод является большим шагом вперед, так как он значительно расширяет имеющийся довольно скудный арсенал средств для ренатурации мембранных белков.

Глава 3 (65 страниц) посвящена исследованию мембраноактивных антибиотических пептидов из четырех различных семейств. Для каждого из изученных пептидов автор не только определил пространственную структуру и динамику в мембраноподобной среде, и выявил взаимодействия, ответственные за формирования комплекса пептид/мембрана, но и предложил модель, описывающую возможный механизм действия. К основным результатам главы 3 можно отнести следующие.

(1) Используя комплекс методов (ЯМР, масс-спектрометрия, секвенирование генов) автору, удалось решить непростую задачу по расшифровке химической и пространственной структуры двух пептидов из семейства лантибиотиков *Lcha* и *Lchβ*. Эта задача была осложнена наличием большого количества посттрансляционных модификаций в пептидах.

По результатам исследований Шенкарев З.О. высказал интересную гипотезу, о том, что пептид Lcha может содержать два различных сайта связывания липида II, что отличает его от других известных лантибиотиков. В то же время предложенная модель действия двухкомпонентного пептида Lcha/Lch β согласуется с механизмами, ранее предложенными для описания антибиотической активности других лантибиотиков.

(2) В уникальных циклических пептидах, содержащих, так называемый, «замкнутый цистеиновый узел», циклотидах Kalata B1 и Kalata B7, автору удалось выявить детерминанты, ответственные за связывание с мембраной и за координацию двухвалентных катионов. Несмотря на то, что, как признает сам автор, последние исследования указывают на связывание в этом сайте аммониевой группы молекулы фосфоэтаноламина, важная роль катион-связывающего сайта в биологической активности пептидов была подтверждена многими более поздними работами. Фактически, как и в случае с нанодисками, результаты представленного исследования послужили началом для целого направления в структурно-функциональных исследованиях растительных пептидов.

(3) В мембраноподобной среде была определена структура димера пептида апеницина, имеющего конформацию β -шпильки, ранее подобные структуры определяли только с низким разрешением, используя методы ЯМР твердого тела. Были прослежены изменения в динамике пептида возникающие при взаимодействии с мембраной и приведены оценки изменения конформационной энтропии в ходе этого процесса. По результатам автор высказывает интересную гипотезу о том, что в определении селективности взаимодействия антибиотических пептидов на мембраны различных организмов может играть роль не только распределение заряженных и гидрофобных участков на поверхности пептида, но также и его подвижность.

(4) Результаты исследования пептида аурелина, на первый взгляд, противоречат классическому пониманию механизмов, лежащих в основе работы мембраноактивных антибиотиков и токсинов - блокаторов каналов, и тем эти результаты наиболее интересны. Этот пептид одновременно, является слабым антибиотиком и «неправильным» токсином, блокирующим K⁺ каналы при низких значениях pH (<6). Существует большое искушение спекулировать о том, что аурелин является неким промежуточным эволюционным звеном между антимикробными молекулами и токсинами, которые, по современным данным, в некоторых случаях, действительно произошли в ходе «дивергентной» эволюции. Однако автор воздерживается от подобного рода спекуляций, вероятно потому, что за молекулой аурелина может таиться еще не описанная мишень (канал, рецептор) или функция.

В главе 4 (65 страниц) подробно описаны результаты, полученные для двух спиральных каналобразующих пептидов из семейства пептаиболов Aam-I и Zrv-IIb. В ходе

сравнительного исследования структуры и динамики этих гомологичных пептидов Шенкареву З.О. удалось убедительно подтвердить гипотезу о том, что внутримолекулярная подвижность является важным фактором определяющим активность каналобразующих пептидов. Кроме этого в главе 4 описываются еще два интересных результата. Во-первых, это наблюдение кооперативных переходов сравнительно большого фрагмента пептида Aam-I (8 остатков) между конформациями с различным направлением закрутки спирали. Во-вторых, это успешное использование системы «тонких» нанодисков, содержащих короткоцепочечные липиды, для того чтобы стимулировать переход спиральной молекулы в трансмембранное состояние.

Все результаты, полученные в ходе исследований, описанных в главах 3 и 4, имеют большую важность для создания новых антибиотиков. В частности, эти результаты указывают на то, что при конструировании новых антибиотиков, необходимо учитывать не только общие свойства молекулы, гидрофобность, заряд, но и ее конформационную подвижность.

В главе 5 описаны результаты исследования вольт-сенсорного домена канала KvAP в различных средах. Выявлена зависимость структуры и динамики домена от свойств мембраномоделирующего окружения, в частности, показано, что в средах, содержащих анионные детергенты, домен находится в «ненативном» состоянии схожем с состоянием расплавленной глобулы водорастворимых белков. Также были определены термодинамические параметры перехода домена из «расплавленного» состояния в «нативное». Описание «расплавленного» состояния, существование которого у мембранных белков ранее не предполагалось, является важным шагом в решении проблемы фолдинга мембранных белков, одной из важных задач современной биофизики. Использование нанодисков, содержащих липиды различного состава, позволило предположить, что «плавление» структуры связано с разрушением системы межспиральных солевых мостиков, стабилизирующих домен, отрицательно заряженными головками детергента.

По результатам исследования «нативного» состояния домена, наблюдаемого в мембранах нанодисков и мицеллах нейтральных детергентов, автором впервые для мембранного белка были описаны взаимные движения трансмембранных спиралей с характерными временами микросекунды-миллисекунды. На основании динамических данных высказано предположение о возможных конформационных перестройках вольт-сенсорного домена при потенциалозависимой активации. Одним из важных результатов исследований стало построение модели комплекса вольт-сенсорного домена с токсином из яда паука *Grammostola spatulata*, который влияет на процессы потенциал-зависимой активации. Впервые показано, что для блокировки активации домена необязателен прямой

контакт между молекулой токсина и датчиком потенциала – спиралью S4. Результаты, полученные в этой главе, важны как для создания новых методов ренатурации мембранных белков, так и для разработки новых лекарственных препаратов, нацеленных на лечение судорожных расстройств и аритмий, таких например как синдром удлиненного интервала QT.

В главе 6 – заключение, коротко резюмированы основные результаты работы и приводится их обсуждение. Суммирована и выделена роль отдельных взаимодействий и факторов ответственных за структуру и функцию мембранных биомолекул.

В главе 7 описаны объекты исследования, материалы и методы, использованные в диссертационной работе. Кроме ЯМР-спектроскопии в работе использованы современные методы биохимии, молекулярной биологии и молекулярного моделирования. Разнообразие экспериментальных методов и чрезвычайно высокий современный мировой методический уровень исследований З.О. Шенкарева производят очень большое впечатление и выделяют его работу среди тех, с которыми мне довелось познакомиться в последние годы.

Работа очень сложная, требует чрезвычайной концентрации, несмотря на отличный научный язык и прекрасные иллюстрации. В диссертации решались очень непростые многопараметрические задачи.

В качестве недостатков, нисколько не подвергающих сомнению основные результаты и выводы работы, я бы указал следующие.

В литературном обзоре, несмотря на его большой объем, уделено мало внимания альтернативным сурфактантным системам, не содержащим детергентов, для стабилизации мембранных белков и гидрофобных соединений в растворе. Некоторые из подобных систем, такие, например, как амфифолы (Amphipols) и липидные частицы стабилизированные сополимерами стирола и малеиновой кислоты (Styrene Maleic Acid Lipid Particle, SMALPs) в последнее время все чаще используются для стабилизации мембранных белков, и в принципе могут составить серьезную конкуренцию, технологии нанодисков, разрабатываемой автором. Тем удивительнее выглядит отсутствие описания этих синтетических сурфактантов в литературном обзоре и результативной части диссертации.

При обсуждении результатов сравнительного исследования каналообразующих антибиотиков Aam-I и Zrv-IIВ (глава 4) Шенкарев З.О. делает вывод, о том, что повышенная подвижность ослабляет сродство к мембране и каналообразующую активность пептидов. Однако автор совсем не обсуждает тот факт, что для функционирования ионного канала, будь то канал, сформированный пептидом или белком, необходима некоторая конформационная подвижность. С этой точки зрения следует отметить, что даже в стабильном, по мнению автора, пептиде Zrv-IIВ наблюдаются значительные

внутримолекулярные движения на нескольких диапазонах времен (стр. 227-229). На мой взгляд, более правомерным был бы вывод о том, что для наибольшей активности, нужна какая-то оптимальная амплитуда и временной диапазон внутримолекулярных движений, которая конечно зависит от функции пептида/белка.

Эти замечания, впрочем, нисколько не умаляют несомненных достоинств работы. Колоссальный объем проведенных исследований, и их высокий уровень, соответствующий международным стандартам, обеспечивают высокую достоверность всех основных результатов и выводов. Результаты работы прошли апробацию на престижных российских и международных конференциях. Основные результаты исследования Шенкарева З.О. полностью отражены в публикациях в ведущих рецензируемых научных журналах. Список публикаций включает 63 работы, в том числе 23 статьи в рецензируемых изданиях из списка ВАК, главу в монографии и 3 патента РФ. Текст автореферата полностью отражает основные экспериментальные результаты и выводы диссертационной работы.

Суммируя сказанное можно заключить, что по качеству выполненных исследований, по их объему, значимости и научной новизне диссертация Шенкарева З.О. **«Структурно-функциональное состояние мембранных белков и мембраноактивных пептидов по данным ЯМР-спектроскопии»** представляет собой законченное исследование, которое можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области биофизики. Работа соответствует всем требованиям, предъявляемым в п. 9 и п. 10 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Профессор кафедры органической химия
МИТХТ им. М.В.Ломоносова, д.х.н.
Каплун А.П.

Подпись

А.П. Каплун

УДОСТОВЕРЯЮ

Ученый секретарь

МИТХТ им. М.В. Ломоносова



Ю.А. Зрикова

Сведения об оппоненте

Каплун Александр Петрович

доктор химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия»,
профессор

Основное место работы:

Кафедра органической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московского государственного университета тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Основные публикации по теме диссертации

- [1]. В.К. Хлебников, Л.И. Богуславский, В.И. Попенко, А.П. Каплун, В.И. Швец. Метод исследования распределения по глубине лекарственных и диагностических субстанций в сферических аморфных наночастицах на примере наночастиц, полученных из лупановых тритерпеноидов бересты. *Российские нанотехнологии*. (2010) Т. 5, №9, С. 111-115
- [2]. А.П. Каплун, Н.И. Пахарькова, Л.А. Поручикова, Д.А. Безруков, В.И. Попенко, В.И. Швец Сферические аморфные наночастицы, загруженные противотуберкулезной субстанцией рифабутином *Вестник МИТХТ* (2010) Т. 5 №3 С. 73-75
- [3]. А. П. Каплун, Д. А. Безруков, В. И. Швец Рациональный дизайн нано- и микроразмерных лекарственных форм биологически активных субстанций. *Биотехнология* 2010. - № 6. С. 9-18
- [4]. Дубовик Е. Г., Безруков Д.А., Каплун А.П., Швец В.И. Способ получения липосом. Патент RU 2423967 С1 Заявка на выдачу патента РФ 2009145012/15, 04.12.2009, дата подачи (приоритет) 4.12.2010. Опубликовано: 20.07.2011
- [5]. Цалман А. Я., Безруков Д. А., Каплун А. П., Поручикова Л. А., Швец В. И Способ выделения смеси для получения водных дисперсий сферических наночастиц. Патент RU 2424516 С1 Заявка на выдачу патента РФ 2009140172/15, дата подачи (приоритет) 30.10.2009 Опубликовано: 20.07.2011
- [6]. А.А.Пальцын, С.В.Комиссарова, А.П.Каплун. Способ флуоресцентно-микроскопического определения эндоцитоза наночастиц тромбоцитами. *Клеточные технологии* (2011) №2 С. 103-106

- [7]. А.П.Каплун, Д.А.Безруков, В.И.Швец, В.И.Попенко Сферические аморфные наночастицы из тритерпеноидов бересты – новый тип субмикронных средств доставки лекарственных субстанций. *Биофармжурнал*, 2011, т. 3. № 2, С.28-40.
- [8]. Суслина З.А., Сейфулла Р.Д., Ионова В.Г., Каплун А.П., Прохоров Д.И., Шилова А.Г. Влияние ацетилсалициловой кислоты в комплексе с липидными наноструктурами различного состава на агрегацию тромбоцитов человека. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, 2011.-N 5.-С.31-34.
- [9]. Каплун А. П., Безруков Д. А., Швец В. И., Кубатиев А. А. Наноразмерные лекарственные формы: взаимосвязь структура–свойства. *Нанотехнологии и охрана здоровья* Т. 3. № 2 (7) – 2011 С. 10-15.
- [10]. Э.А. Христич, Е.А. Мишихина, В.К. Хлебников, А.П. Каплун, В.И. Попенко, Т.М. Буслаева, Л.И. Богуславский Система двух смешивающихся жидкостей как генератор наночастиц. синтез наночастиц $baso_4$ при контакте растворов прекурсоров в воде и тетрагидрофуране *Вестник МИТХТ*, 2011, т. 6, № 4. С. 40-46
- [11]. Рукосуева Н.В., Захарова Д.А., Безруков Д.А., Каплун А.П., Швец В.И., Зигангирова Н.А. Липосомальная форма десферала как эффективный противохламидийный агент. *Вестник МИТХТ*. 2012. Т. 7, №6, С. 22-26
- [12]. Е. В. Ахидова, Т. Д. Волкова, Д. О. Короев, И. Ю. Якупов, М. В. Калинин, Л. Э. Завалишина, А. П. Каплун, О. О. Жарская, О. В. Зацепина, О. М. Вольпина. Получение аффинноочищенных противопептидных антител к сурвивину для структурно-функциональных исследований белка. *Биоорган. химия*, 2013, Т. 39, № 3, С. 326–337
- [13]. Каплун А.П., Красильникова В.В., Кубатиев А.А. Наноразмерные лекарственные формы для доставки белков. *Патогенез*. - 2013. - Т.11, №2. - С. 4-16
- [14]. Филиппов А.Г., Каплун А.П., Кубатиев А.А. Получение наночастиц серебра с использованием полифенолов и оценка их влияния на клетки перитонеальной полости мышей C57BL/6 in vivo. *Патогенез*. - 2013. - Т.11, №4. - С. 59-63
- [15]. Н.В. Рукосуева, А.П. Каплун, Н.А. Зигангирова, Л.Н. Капотина, В.И. Швец Антихламидийная активность липосом с ресвератролом *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*. -2014 - №6 С. 47-52