“УТВЕРЖДАЮ”
Проректор по научной работе
Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Российский университет дружбы народов»
д.ф.н., профессор,
Н.С. Кирабаев

“27” октября 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу
к.ф.-м.н. 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.

Работа З.О. Шенкарева посвящена исследованию пространственной структуры и динамики мембранных белков и пептидов, а также установлению механизмов функционирования этих молекул. В качестве основного метода исследования выбран один из наиболее мощных спектроскопических методов – спектроскопия ЯМР высокого разрешения. Значительная часть диссертации посвящена разработке новых методов, позволяющих проводить ЯМР-исследования мембранных биомолекул в окружении по своим свойствам максимально приближенным к свойствам природных биологических мембран.

Актуальность исследований, нацеленных на установление взаимосвязи между структурой и функцией мембранных белков и пептидов, не вызывает сомнений. Эти молекулы представляют важные объекты как для фундаментальных работ в области биофизики и молекулярной биологии, так и для решения множества прикладных задач медицины и биотехнологии. Несмотря на практически 30-ти летнюю историю структурных исследований мембранных белков и пептидов, получение структурно-динамических характеристик для этих молекул с атомным разрешением и по сей день представляет непростую задачу. В основном это связано с тем, что мембранные молекулы невозможно рассматривать «в отрыве» от окружения, свойства которого оказывают огромное влияние на их структуру и функцию. О величине этого вклада говорит тот факт, что многие мембранные белки в отсутствии липидного бислоя формируют ненативные структуры или нерастворимые агрегаты. Как следствие мембранные биомолекулы с большим трудом поддаются кристаллизации, а спектроскопические исследования осложнены необходимостью получения белковых препаратов, сохраняющих нативное состояние в течение длительного времени.

Объединение подходов основанных на использовании специальных «мембраномоделирующих» сред и методов ЯМР-спектроскопии высокого разрешения предоставляет уникальную возможность для изучения пространственной структуры и внутримолекулярной динамики мембранных белков и пептидов. Развитие этого комплексного подхода, чему и посвящена представленная работа, является весьма

актуальной задачей. Таким образом, актуальность работы Шенкарева З.О., прежде всего, определяется именно комплексностью использованного подхода, в центре которого находится ЯМР-эксперимент, но включено также широкое разнообразие методов: от создания новых «мембраномоделирующих» сред и протоколов рекомбинантной продукции мембранных белков, до анализа термодинамических параметров процесса фолдинга белка и расчетов молекулярной динамики. Именно применение комплексного подхода к ряду объектов, отличающихся по своему строению, физико-химическим свойствам и функциям, позволило в представленной работе получить информацию об общих принципах структурной организации мембранных белков и пептидов, а также сделать предположения о молекулярных механизмах, лежащих в основе функционирования пептидных антибиотиков и потенциал-зависимых ионных каналов. Важность этих объектов для исследований и практических разработок в области медицины дополнительно увеличивает актуальность работы.

Диссертационная работа Шенкарева З.О. построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, семи глав, выводов, списка использованной литературы (540 источников). Глава 1 включает обзор принципов метода ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, а также «мембраномоделирующих» сред, используемых для стабилизации мембранных белков и пептидов в растворе. Отдельные части главы 1 посвящены описанию свойств новой среды – нанодисков, созданной на основе липопротеинов высокой плотности, а также обзору современного состояния в области исследований антибиотических мембраноактивных пептидов и потенциал-зависимых К+ каналов. Глава 2 посвящена разработке методов применения нанодисков для ЯМР-исследований мембранных молекул и ренатурации рекомбинантных мембранных белков. В главе 3 описываются полученные автором результаты исследования структуры и динамики антибиотических пептидов, содержащих внутримолекулярные циклы, и приводятся гипотезы их функционирования. Глава 4 посвящена изучению связи структура-динамика-функция для спиральных каналообразующих пептидов, на примере антибиотиков Aam-I и Zrv-IIB. В главе 5 описываются результаты исследования потенциал-чувствительного домена канала KvAP. Приведено детальное описание структуры и динамики двух состояний домена «нативного» и «расплавленного», охарактеризовано взаимодействие домена с токсином паука, ингибирующим потенциал-зависимую активацию, а также высказана гипотеза о механизме активации домена при изменении мембранного потенциала. Глава 6 – заключение, содержит обобщение всех полученных в работе результатов. В главе 7 автор перечисляет материалы и описывает методы, использованные в работе.

Научная значимость и одновременно **новизна** результатов работы определяется тем, что в ее рамках была введена новая среда для ЯМР-экспериментов – липид-белковые нанодиски, использование которой делает возможным структурно-динамические исследования мембранных биомолекул с практически атомным разрешением в липидном бислое. С использованием различных мембраномоделирующих сред в работе были расшифрованы трехмерные структуры и получены динамические характеристики для нескольких ранее неизученных белков и пептидов и охарактеризованы конформационные перестройки, возникающие при взаимодействии этих молекул с мембраной. В результате обобщения полученных данных была выделена роль различных взаимодействий (ковалентных, электростатических, гидрофобных) и внутримолекулярной динамики в функционировании мембранных молекул. К результатам работы, обладающим несомненной научной значимостью, можно дополнительно отнести детальное описание состояния «расплавленной глобулы» для мембранного белка, которое как

считалось ранее свойственно только водорастворимым глобулярным молекулам, а также определение термодинамических параметров процесса фолдинга мембранного белка *in vitro*. Одним из наиболее удивительных является вывод о том, что в отличие от большинства глобулярных белков фолдинг мембранного белка в окружении мицелл детергентов может быть эндотермическим процессом и сопровождаться увеличением энтропии системы. Кроме того, важным результатом работы является описание структуры комплекса токсина VSTx1 и потенциал-чувствительного домена KvAP, который позволят по новому взглянуть на возможные механизмы регуляции ионных каналов.

В работе можно выделить следующие основные результаты, обладающие **новизной**:

1. Разработана методология применения нанодисков, в качестве среды для исследования мембранных биомолекул методами ЯМР высокого разрешения.
2. Разработан метод ренатурации мембранных белков с использованием нанодисков.
3. Определены пространственные структуры и динамические характеристики для следующих антибиотических пептидов: Lchα, Lchβ, KB1, KB7, ареницина-2, аурелина, Aam-I и Zrv-IIB. Предложены модели мембранной активности пептидов.
4. В молекулах KB1 и KB7 обнаружены и охарактеризованы сайты связывания двухвалентных катионов.
5. В мембраноподобном окружении определена полноатомная пространственная структура димера ареницина-2.
6. Для аурелина, охарактеризовано специфическое токсин-подобное действие на K+-каналы.
7. Показано, что повышенная конформационная подвижность пептидов негативно влияет на их сродство к мембране и антибиотическую активность.
8. В структуре потенциал-чувствительного домена K+-канала KvAP описаны мкс-мс движения спиралей, задействованные в потенциалозависимой активации.
9. Охарактеризована структура «расплавленного» состояния и термодинамические характеристики процесса фолдинга потенциал-чувствительного домена KvAP.
10. Описаны структурные аспекты взаимодействия нейротоксинов NTII и VSTx1 с мембранами. Охарактеризована структура комплекса VSTx1/домен KvAP и высказана гипотеза о молекулярном механизме действия токсина.

Практическое значение результатов работы определяется тем, что в ней содержатся предпосылки для разработок в области дизайна новых лекарственных соединений, а также предложены новые методы получения стабильных в растворе препаратов мембранных белков. В частности, пространственные структуры и данные о механизме действия природных антибиотических пептидов могут послужить основой для создания новых синтетических антибиотиков. Данные о механизме регуляции K+ каналов токсинами, влияющими на потенциал-зависимую активацию, могут подтолкнуть процесс разработки новых противосудорожных и антиаритмических препаратов. Мембранные рецепторы и ферменты, инкапсулированные в нанодиски, могут использоваться для скрининга прототипов лекарств, а также для осуществления различных химических реакций с участием гидрофобных соединений.

Представленные в работе результаты очень обширны и по методам, и по числу и биологической значимости объектов исследования. Материал грамотно изложен и подтвержден публикациями в отечественных и зарубежных изданиях. Список публикаций включает 63 работы, в том числе 23 статьи в рецензируемых изданиях из списка ВАК, 1 главу из книги и 3 патента РФ. Результаты исследований Шенкарева З.О. прошли апробацию на отечественных и международных научных конференциях.

Однако работа не свободна от ряда недостатков. Так, в работе не обсуждается

роль состояния «расплавленной глобулы» в синтезе, фолдинге и функционировании мембранных белков *in vivo*. Результаты, полученные в средах, содержащих детергенты, с большой натяжкой могут быть перенесены в живую клетку, в которой для биосинтеза белков используются специальные механизмы. Кроме того, проблематике задачи по изучению фолдинга мембранных белков могло бы быть уделено большее внимание во введении, литературном обзоре и заключении диссертации. К недостаткам работы можно также отнести ряд опечаток, пунктуационных ошибок и частое использование англицизмов и научного жаргона.

Указанные недостатки не носят принципиального характера и, безусловно, не снижают общей, весьма положительной, оценки работы и ее результатов.

Результаты и выводы диссертации могут быть использованы в исследовании структуры и моделировании функций биологической мембраны, как целого, так и различных белков и пептидов, ответственных за ее функции, а также при проектировании новых биомедицинских соединений и скрининге молекул – кандидатов. Результаты работы могут быть использованы в следующих организациях: ИБХ РАН, ИНБИ РАН, ИМБП РАН, ИТЭБ РАН, ИМБ РАН, ИБМХ РАМН, Центр «Биоинженерия» РАН, а также на биологическом факультете МГУ им. Ломоносова.

Материалы диссертации используются при чтении курса «Физико-химические методы исследования биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов» студентам, обучающимся в Учебно-научном центре ИБХ РАН. Современные методы, изложенные в диссертации, используются студентами и аспирантами при выполнении курсовых, дипломных, магистерских и диссертационных работ. На основании литературного обзора и результатов диссертации рекомендовано создание отдельного курса лекций "ЯМР-спектроскопия для установления структуры белков и пептидов". Такой курс необходим при подготовке студентов и аспирантов обучающихся по следующим специальностям: биофизика, биохимия, молекулярная биология и может быть рекомендован как для вузов (МГУ, РУДН, МИТХТ, МФТИ), так и для научно-исследовательских институтов, в которых проводится дополнительная подготовка студентов (ИБХ РАН, ИМБ РАН, НИИ ФХМ ФМБА).

Диссертация представляет собой завершенное исследование, выполненное З.О. Шенкаревым на высоком научно-методическом уровне. Анализ представленного диссертантом материала свидетельствует о достоверности полученных автором результатов и обоснованности сделанных выводов. Автореферат и публикации соответствуют содержанию диссертации. Можно заключить, что диссертация Шенкарева З.О. «Структурно-функциональное состояние мембранных белков и мембраноактивных пептидов по данным ЯМР-спектроскопии» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое научное достижение. Диссертация Шенкарева З.О. полностью соответствует требованиям, установленным в пунктах 9 и 10 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой искомой степени по специальности 03.01.02 (биофизика).

Отзыв на диссертационную работу Шенкарева Захара Олеговича подготовлен профессором международного уровня кафедры системной экологии, д.х.н, профессором Калабиным Г.А., заслушан и утвержден на совместном научном семинаре кафедры системной экологии РУДН и Центра коллективного пользования (НОЦ) РУДН Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения

высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов» 20 октября 2014 г, протокол №2.

Профессор кафедры системной экологии РУДН,
Директор Центра прецизионных инструментальных
методов анализа («Прима») ЦКП (НОЦ) РУДН,
д.х.н., профессор Калабин Г.А.

Декан экологического факультета РУДН,
д.б.н., профессор Черных Н.А.

Сведения о ведущей организации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН)

117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6

Тел.: +7 (495) 434-53-00

Факс: +7(495) 433-95-88

Адрес сайта: http://www.rudn.ru

Основные публикации сотрудников ведущей организации по теме диссертации

1) Abramovich, R.A., Kovaleva, S.A., Goryainov, S.V., Vorobyev, A.N., Kalabin, G.A. «Rapid analysis of suppositories by quantitative1H NMR spectroscopy» (Article) // Antibiotiki i Khimioterapiya Volume 57, Issue 5-6, 2012, Pages 3-6

2) Sadykov, B.R., Starikov, V.P., Sadykov, R.Kh., Kalabin, G.A. «Determination of the fractional composition of merchantable oil using quantitative 1H NMR spectra» (Article) // Petroleum Chemistry Volume 52, Issue 1, January 2012, Pages 22-27

3) Ionova, N.I., Zemskii, D.N., Sadykov, B.R., Goryainov, S.V., Kalabin, G.A. «Synthesis, structure, and properties of new antioxidants based on hydroxypropylated p-aminodiphenylamine» (Article) // Petroleum Chemistry Volume 51, Issue 6, November 2011, Pages 454-457

4) Podgorskii, V.V., Mikhalev, A.S., Kalabin, G.A. «Quantitative nmr spectroscopy for quality control of drugs and pharmaceuticals» (Article) // Pharmaceutical Chemistry Journal Volume 45, Issue 3, June 2011, Pages 194-197

5) Proidakov, A.G., Grigor'Ev, D.A., Proidakova, O.A., Sadykov, B.R., Kalabin, G.A. «Kinetic parameters and activation criteria of the oxidative mechanical degradation of coals» (Article) // Solid Fuel Chemistry Volume 44, Issue 6, December 2010, Pages 396-401