

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Веры Александровны Борзовой «МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ШАПЕРОНОВ ПРИ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Актуальность темы диссертационной работы В.А. Борзовой не вызывает никаких сомнений, поскольку агрегация белков является одной из важнейших проблем как биотехнологии, так и медицины. Особое значение изучение особенностей агрегации белков приобрело после появления систем для суперэкспрессии белков как в бактериальных, так и эукариотических культурах. Естественно, что сложная совокупность различных шаперонов, приспособленных для эффективного сворачивания белков в клетке, как правило, не может помочь достигнуть нативной конформации тем белкам, которые синтезируются в большом количестве. Возможно, что именно эта причина может быть стать одним из ограничений при применении генномодифицированных организмов. Не меньшее значение имеют медицинские аспекты, поскольку амилоидная агрегация белков лежит в основе наиболее загадочных нейродегенеративных заболеваний. В этом случае также особую роль как в возникновении болезни, так и в ее развитии может играть недостаточная эффективность действия различных шаперонов. Работ о влиянии шаперонов на агрегацию белков очень много, однако большинство из них не содержат грамотного количественного анализа наблюдаемых процессов, а именно это является основным элементом представленной диссертационной работы.

Диссертация В.А. Борзовой изложена на 181 стр. и состоит следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты (теория и экспериментальные результаты) и их обсуждение, выводы, заключение, список литературы, содержащий 356 ссылок. Работа хорошо иллюстрирована 83 рисунками и 4 таблицами.

Обзор литературы написан хорошо и позволяет оценить вклад диссертанта в исследуемую проблему. В обзоре довольно кратко рассмотрены исследования, связанные с изучением агрегации белков. Особое внимание уделено моделям агрегации и

классификации агрегатов различной структуры. Кроме того, подробно описана информация о всех основных объектах исследования: использованных в работе белково-мишеней (БСА, α -лактальбумин коровьего молока, ГД из печени быка), а также белкового шаперона α -кристаллина. Отдельные разделы посвящены свойствам и применению «химических шаперонов» (аргинина, его производных и пролина).

По обзору литературы есть несколько небольших замечаний. Автором хорошо и подробно, возможно, что даже слишком подробно, описаны основные объекты исследования – белки, в том числе и обладающие шапероно-подобной активностью, а также «химические шапероны». А вот проблеме защитного действия шаперонов, их функциям, агрегации белков уделено меньше внимания. Нет четкого разделения шаперонов и белков, обладающих шапероно-подобной активностью. Понятно, что шапероны и шаперонины лежат за рамками данного исследования, но, по крайней мере, четко разграничить сферы интересов автора было необходимо. Только на 60-ой странице автор начинает использовать термин «шапероно-подобная» активность. А ведь очевидно, что все кинетические подходы, которые применил автор, могут не работать, например, в случае сложных энергозависимых шаперонов. По этой же причине название работы не совсем соответствует ее содержанию, поскольку «настоящие» шапероны не были исследованы в работе. На мой взгляд, термин «химические шапероны» - это дань моде, зародившейся еще лет 20 назад. На самом деле это просто химические соединения, обладающие определенной антиагрегационной активностью, а совсем не «помощники» в правильном сворачивании белков, как предполагалось при первоначальном введении термина «шаперон». В целом биологические аспекты агрегации белков и роли шаперонов в этом процессе освещены неполно, а ведь диссертация по биологическим наукам. Из мелких замечаний. Нет в русском языке «болезни Хантингтона» - есть «болезнь Гентингтона». Если автору больше нравится английское произношение, то и следовало бы писать и «болезнь Альцхаймера». Ссылки на русские работы в списке литературы должны идти перед ссылками на английскими (в списке сокращений, кстати, именно так и сделано). Так что и здесь надо было быть более последовательной.

Хорошее впечатление производит методический раздел работы. Этот раздел позволяет сделать вывод, что автор овладел многими методами, хорошо в них разбирается, умеет обработать результаты многообразных экспериментов. Однако мне кажется, что для традиционных методов, которые уже много лет используются в данной лаборатории, не было необходимости столь подробного описания, включая теоретическую часть. Кстати, если все эти разделы были заново написаны автором, то

просто жаль его времени, а если скопированы из работ предшественников, то есть шанс получить упреки в плагиате. Совершенно необоснованные на взгляд специалистов, но приятные для борцов с плагиатом. А вот новый, по крайней мере для меня, метод «фракционирования в поле асимметричного потока» украсили бы фотографии прибора и большее количество технических деталей.

В разделе «Результаты и их обсуждение» понятно и логично изложена полученная автором информация. Основным достижением диссертанта, на мой взгляд, является применение точных количественных подходов, разработанных в лаборатории Бориса Ивановича Курганова, для анализа механизмов денатурации и агрегации различных белков. Хорошо, что проведению экспериментов предшествовал теоретический анализ используемых моделей агрегации белков. В результате такого подхода был выяснен механизм тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА). Для этого автором был использован весь доступный арсенал методов (дифференциальная сканирующая калориметрия, измерение кинетики агрегации с использованием динамического светорассеяния, фракционирование в поле асимметричного потока и аналитическое ультрацентрифугирование), дополненный скрупулёзным кинетическим анализом. Предложенная модель агрегации БСА предполагает образование двух форм нативного белка с различной способностью к агрегации. Одна из форм характеризуется высокой скоростью агрегации, приводящей к образованию первичных агрегатов. Вторая форма вовлекается в процесс агрегации путем присоединения к первичным агрегатам и, кроме того, способна образовывать стабильные агрегаты относительно небольших размеров. На мой взгляд, именно обнаружение двух форм, обладающих разной способностью агрегации, является наиболее интересным результатом, «изюминкой» работы, хотя хотелось бы более подробного обсуждения их особенностей. Важен вывод о том, что при тепловой агрегации и агрегации, индуцируемой дитиотреитолом, скорость-лимитирующие стадии агрегации различаются. Однако, строго говоря, стадии денатурации не относятся к агрегации белка. То есть агрегация протекает в обоих случаях одинаково, а вот соотношения скоростей агрегации и денатурации – действительно различаются. В целом мне очень понравились подходы к изучению агрегации, основанные на ее индукции дитиотреитолом (как в случае БСА, так и для альфа-лактальбумина). Полагаю, что такой подход позволяет получить более воспроизводимые результаты, чем при традиционной термоденатурации.

Отдельный раздел посвящен определению антиагрегационной активности альфа-кристаллина (нативного, сшитого глутаровым альдегидом и облученного

ультрафиолетовым светом). Использование разных форм альфа-кристаллина позволило сделать важные выводы о влиянии четвертичной структуры и важности поддержания его структуры в нативном состоянии для осуществления шапероно-подобной функции. Полезным для специалистов, занимающихся белковыми шаперонами, является введение понятия адсорбционной емкости шаперона по отношению к белку-мишени.

Для изучения химических антиагрегантов удобным представляется использование термина «концентрация полунасыщения», которая характеризует сродство реагента к белку-мишени. Применимость предложенных метода оценки антиагрегационной активности была продемонстрирована для пролина, аргинина и его производных (аргининамида и этилового эфира аргинина) с использованием упомянутых выше тест-систем.

Несколько особняком стоят опыты с глутаматдегидрогеназы из печени быка. Однако они не менее интересны, поскольку именно на этом ферменте автором были разработаны подходы для количественной оценки влияния различных агентов на агрегацию белков-мишеней при нагревании раствора белка с постоянной скоростью. Было бы полезно дополнить проведенные эксперименты измерениями каталитической активности в ходе термоденатурации.

По данному разделу есть несколько небольших вопросов и замечаний. На стр. 70 и далее подробно описаны опыты по проведению ДСК после предварительного прогревания БСА в течение разных интервалов времени. Я не очень понял смысл этого исследования. По исходной кривой ДСК можно сделать сходные выводы, может быть не столь точные количественно. В этом и прелесть ДСК, что не надо греть белок при одной температуре в течение разных интервалов времени, а сразу получить информацию, что, например, при постепенном нагреве до 65 градусов половина белка денатурирует. Похожий результат и был получен более сложным путем. На стр. 78 следовало бы пояснить фразу о «перестройке дисульфидных связей». В каких условиях она происходит? Хотелось бы более четкого представления о природе «низкорреакционноспособной развернутой формы». Что же это такое и в чем ее отличия от «высокорреакционноспособной развернутой формы»? Стр. 89, рис. 3.18. Вопрос по рисунку Б. Структура белковых агрегатов резко изменяется по сравнению с рис. А, но есть ли это следствие постепенного изменения агрегационного состояния белка или присутствия вируса табачной мозаики – неясно. Стр. 94-95: каковы причины столь резкого уменьшения дзета-потенциала? Может быть, вообще какие-то формы белка с существенными пост-трансляционными модификациями? В опытах по индукции агрегации ДТТ автор еще и нагревает белок.

Зачем это нужно и что будет без нагрева? Возможно, что только нагретый и немного развернутый белок обладает доступными для восстановления дисульфидными связями? В целом надо было бы подробнее обсудить вопрос о дисульфидных связях БСА. Какие именно дисульфидные связи восстанавливаются? Как они расположены в молекуле белка (например, по данным кристаллографии)? Возможно ли замыкание новых дисульфидных связей, особенно при длительной инкубации по мере уменьшения действующей концентрации ДТТ? Довольно трудно анализировать результаты гель-проникающей хроматографии сшитого глутаровым альдегидом и УФ альфа-кристаллина, поскольку не использованы маркеры молекулярной массы. По каким причинам различаются времена элюции в двух опытах (стр. 114 и 132)? Автором приведены данные ДСК для облученного УФ альфа-кристаллина и сделан вывод о сохранении определенного количества нативного белка в таком препарате. Означает ли это, что «сшитый» кристаллин может быть полностью нативным или просто в препарате есть доля немодифицированного белка? По опытам с глутаматдегидрогеназой есть только одно замечание. Автор обнаружил дестабилизирующее действие NADH на фермент. Известно, что в препаратах NADH обычно присутствует некоторое количество его производных, обладающих инактивирующим действием на NAD-зависимые дегидрогеназы. Исключить такое ингибирование можно только проведением хроматографической очистки с последующим хранением кофермента в бескислородной среде («под азотом»). Было бы неплохо проверить сохранение каталитической активности глутаматдегидрогеназы в присутствии данного кофактора, тем более, что, как правило, восстановленный и окисленный кофактор оказывают одинаковое стабилизирующее действие на NAD-зависимые дегидрогеназы.

Безусловно, сделанные замечания не умаляют ценности сделанной работы.

Таким образом, можно с уверенностью сказать, что В.А. Борзовой была проведена большая, интересная и важная как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте работа. Основные результаты работы изложены в диссертации и опубликованы в журналах из списка ВАК, а сделанные автором выводы соответствуют полученным результатам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Веры Александровны Борзовой «МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ШАПЕРОНОВ ПРИ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ», является законченным квалификационным научным исследованием и по содержанию полностью

соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 N 842, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Вера Александровна Борзова заслуживает присуждения искомой степени по специальности: 03.01.04 – биохимия.

Владимир Израилевич Муронец

доктор биологических наук, профессор,
03.01.04 Биохимия,
заведующий отделом биохимии животной клетки

Научно-исследовательского института физико-химической
биологии имени А.Н. Белозерского

Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Контактный телефон: +7(495)939-14-56

Рабочий адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40

E-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru

« 30 » мая 2016г.



Подпись В.И. Муронца заверяю

Директор научно-исследовательского института

физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Московского государственного университета

имени М.В. Ломоносова

академик, профессор



В.П. Скулачев