

Отзыв
официального оппонента на диссертационную работу Борзовой Веры Александровны «Механизмы защитного действия шаперонов при агрегации белков», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Изучение агрегации белков представляет собой важную фундаментальную проблему биохимии, а также связано с решением целого ряда прикладных задач биотехнологии и медицины. Процессы агрегации белков непосредственно связаны с развитием «конформационных болезней» - целого ряда заболеваний, которые характеризуются накоплением агрегатов неправильно свернутых белков и последующей деградацией клеток. При получении рекомбинантных белков, производстве белковых препаратов различного назначения биотехнологии также сталкиваются с проблемой агрегации.

Правильное сворачивание и предотвращение агрегации белков в клетках обеспечивает «система контроля качества», состоящая из различных белков-шаперонов и белков, выполняющих шапероноподобные функции. В частности, к таким белкам относится суперсемейство малых белков теплового шока, представителем которого является альфа-кристаллин. Этот белок обнаружен в хрусталике глаза, его составляющие (αA и αB кристаллин) присутствуют также в других тканях, например, в мышцах, мозге. Изучение антиагрегационной активности этого белка и ее изменения под действием различных факторов имеет особое значение, так как альфа-кристаллин так или иначе вовлечен в развитие целого ряда патологий: катаракты, кардиомиопатий, нейродегенеративных заболеваний, в литературе существуют данные о роли альфа-кристаллина в апоптозе и канцерогенезе.

В качестве антиагрегационного агента небелковой природы широкое распространение получил аргинин. В биотехнологии, при очистке и рефолдинге рекомбинантных белков из телец включения, аргинин применяется в достаточно высоких концентрациях (порядка 1 М). Важной проблемой остается поиск антиагрегационных соединений, которые обладают более высокой эффективностью и, следовательно, могут применяться в более низких концентрациях. Решение этой проблемы может представлять интерес не только для биотехнологии, но, в перспективе, и для исследований медицинской направленности.

В этой связи представленную диссертационную работу В.А. Борзовой можно считать весьма актуальной, поскольку в ней исследуются механизмы влияния модификаций (сшивания глутаровым альдегидом и облучения ультрафиолетовым светом) на активность альфа-кристаллина, механизмы подавления агрегации белков не только аргинином, но

также его производными и пролином и влияние на термостабильность белков лигандов, специфически связывающихся с этими белками. Кроме того, предлагаются подходы к анализу механизмов агрегации белков в тест-системах, широко используемых для изучения агрегации, и, что особо важно, методы строгой количественной оценки антиагрегационной активности как малых белков теплового шока, так и низкомолекулярных соединений.

Диссертация построена по общепринятой схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающей 356 ссылок. Работа изложена на 181 странице печатного текста и иллюстрирована 83 рисунками.

Во введении хорошо обоснована актуальность проведенного исследования, четко обозначены цель и задачи работы. Обзор литературы содержит современные сведения о причинах и механизмах агрегации белков, классификации агрегатов, свойствах, структуре, функциях и особенностях агрегации белков-мишеней (бычьего сывороточного альбумина, альфа-лактальбумина и глутаматдегидрогеназы из печени быка), структуре и функциях малого белка теплового шока альфа-кристаллина, свойствах, применении и механизмах действия низкомолекулярных химических шаперонов. Обзор литературы включает ссылки как на классические работы, так и на публикации самых последних лет, иллюстрирован рисунками и схемами и наглядно свидетельствует о том, что диссертантом проделана большая работа по изучению и систематизации имеющихся литературных данных. Однако не понятно, почему диссертант не сослалась на мои статьи, посвященные агрегации белков, тем более, что ряд объектов и методов практически одинаковы (Векшин Н.Л. Размеры белков и стехиометрия в шапероновом комплексе SecB-RBPTI, оцениваемые по флуоресценции ANS. // Биохимия, 1998, т.63, вып.4, с.141-144. Векшин Н.Л., Сухарев В.И. Термическая денатурация и агрегация кристаллина. // Биофизика, 2005, т.50, № 2, 236-242. Векшин Н.Л. К вопросу о предотвращении агрегации инсулина кристаллином. // Биохимия. 2008. Т.73. № 4. 562-567).

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные автором современные методы исследования (динамическое светорассеяние, дифференциальная сканирующая калориметрия, фракционирование в поле асимметричного потока, аналитическое ультрацентрифугирование, спектроскопические методы и др.). Успешное сочетание различных методов позволило автору провести оригинальное исследование и получить важные результаты, имеющие теоретическую и практическую значимость.

В основной части диссертационной работы В.А. Борзовой представлены как теоретические подходы к анализу кинетики агрегации белков и количественной оценке антиагрегационной активности шаперонов, разработанные диссертантом, так и экспериментальные данные по кинетике агрегации модельных белков-мишеней. Обоснована необходимость изучения механизма агрегации модельных белков и установления кинетического режима их агрегации. На основе кинетического режима предложена классификация тест-систем, которая может быть применена как для новой интерпретации уже имеющихся литературных данных по подавлению агрегации белков, так и при анализе экспериментальных данных в дальнейшем. Изложенные приемы анализа обладают теоретической и практической научной ценностью, поскольку их использование может способствовать установлению фундаментальных закономерностей и механизмов агрегации белков и механизмов действия шаперонов, а также применяться в биотехнологии и медицинской биохимии при разработке способов подавления агрегации белков.

Экспериментальные результаты обладают значительной новизной. Впервые установлен механизм тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина при нейтральных значениях рН. Образующиеся агрегаты охарактеризованы с помощью широкого спектра методов, среди которых трансмиссионная электронная микроскопия, методы флуоресцентной спектроскопии, динамическое светорассеяние, аналитическое ультрацентрифугирование и другие методы. Возможность использования изучаемых тест-систем на основе бычьего сывороточного альбумина строго обоснована с использованием сопоставления прямого и непрямого методов изучения кинетики агрегации (фракционирования в поле асимметричного потока и динамического светорассеяния, соответственно). Установлено соотношение между скоростью агрегации и длительностью лаг-периода для дитиотреитол-индуцированной агрегации альфа-лактальбумина. Ранее такое соотношение было показано только для амилоидной фибрилляции.

Исследовано и количественно охарактеризовано влияние сшивания и облучения ультрафиолетовым светом на антиагрегационную активность малого белка теплового шока альфа-кристаллина из хрусталика глаза быка. Показано, что как в случае химической модификации, так и в случае облучения снижение активности происходит не только за счет сшивания; значительный вклад вносит разрушение нативной структуры мономеров альфа-кристаллина. В работе был установлен вклад каждого из этих эффектов в снижение антиагрегационной активности. Полученный результат может иметь в перспективе важное практическое значение, например, при определении способности подавлять агрегацию белков для мутантных форм малых белков теплового шока.

С помощью разработанных автором диссертации подходов к анализу кинетики агрегации и ее подавления различными агентами сравнительно охарактеризована антиагрегационная активность таких низкомолекулярных соединений, как аргинин и его производные (аргининамид и этиловый эфир аргинина), которые применяются в биотехнологии при рефолдинге белков, и пролин, являющийся природным защитным агентом в некоторых живых организмах. Показано, что производные аргинина обладают более высокой антиагрегационной активностью. Полученный результат убедительно доказывает возможность применения разработанных подходов. Что касается научно-теоретической важности этой части работы, то было установлено влияние изучаемых низкомолекулярных соединений на кинетический режим агрегации модельного белка и показано изменение механизма агрегации под действием аргинина в случае тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина.

Исследованы кинетика и механизм тепловой агрегации глутаматдегидрогеназы из печени быка при нагревании с постоянной скоростью. Кроме того, диссертантом были получены результаты по влиянию специфических лигандов на термостабильность глутаматдегидрогеназы. В диссертации предложен и успешно применен в экспериментах новый способ анализа кинетических кривых агрегации, который в дальнейшем может быть использован для скрининга соединений, специфически связывающихся с белками и влияющих на их стабильность. Такой скрининг представляет интерес для медицинской биохимии при поиске соединений, эффективно и специфично влияющих на стабильность определенных белковых мишеней.

К несомненным достоинствам работы следует отнести использование в исследованиях целого арсенала биофизических методов, дающих взаимно дополняющую информацию о процессах денатурации и агрегации. Диссертант применяет для описания кинетики денатурации и агрегации белков обширный математический аппарат, что редко встречается в биохимических работах.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что диссертация В.А. Борзовой посвящена актуальной проблеме, представляющей научный интерес, выполнена на высоком современном уровне и содержит новые оригинальные экспериментальные результаты. Диссертационная работа включает наглядно оформленные материалы и написана хорошим научным языком. Достоверность всех полученных данных не вызывает сомнений. Окончательные выводы полностью основаны на экспериментальных данных и не вызывают возражений.

Однако можно поспорить по поводу точки зрения диссертанта на особую важность в УФ денатурации белков такой причины, как фотолиз триптофановых остатков. Давно

установлено (Рубенчик А.Я., Конев С.В. // Мол. биол., 1976, т.10, с.142-148) что скорость УФ-фотоинактивации ферментов в несколько раз выше, чем скорость фотолиза триптофановых остатков. Причиной этого является фотоконформационная релаксация, возникающая в наносекундной области (Векшин Н.Л. Фотоиндуцированная конформационная подвижность белков. // Биофизика, 2012, т. 57, № 5, с.741-745). Кроме того, хотелось бы отметить, что вместо дифференциальной сканирующей калориметрии, где происходит медленный прогрев образца во времени, лучше было бы использовать нанокалориметрическую детекцию тепловыделения или теплопоглощения в ходе денатурации при мгновенно фиксированной температуре (Котельников Г.В., Моисеева С.П. Модуляционный нанокалориметр в исследованиях термической денатурации белков, // Науч. приборостр., 2015, т.25, с.40-44).

Следует отметить, что высказанные замечания носят полемический характер и не влияют на общее положительное впечатление от этой интересной работы. Хорошим свидетельством ее высокого качества является тот факт, что результаты исследований В.А. Борзовой отражены в 5 статьях, опубликованных в ведущих рецензируемых международных журналах, и были представлены на ряде отечественных и международных конференций. Автореферат и публикации полностью отражают основное содержание диссертационной работы.

Все сказанное позволяет заключить, что диссертационная работа представляет собой завершенное научное исследование. По актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений, достоверности полученных данных и выводов, новизне, теоретической и практической значимости представленная диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор, Борзова Вера Александровна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Официальный оппонент
доктор биологических наук 03.01.02 Биофизика,
ведущий научный сотрудник,
лаборатория внутриклеточной сигнализации,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биофизики клетки
Российской академии наук

Векшин Николай Лазаревич



Адрес: 142290 г. Пущино, ул. Институтская-3, ИБК РАН

Контактный тел.: (968) 792-21-41

E-mail: nvekshin@rambler.ru

« 2 » июня 2016 г.

Подпись д.б.н., в.н.с. Векшина Н.Л. заверяю

Подпись
Векшина Н.Л.
заверяю
г.п.н.с. Векшина Н.Л.
02.06.16

