



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе ФГБОУ ВПО

«Российского университета дружбы народов»

Д.Ф.И. профессор

Н.С. Кирабаев



« - » мая 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертационной работы Борзовой Веры Александровны «Механизмы защитного действия шаперонов при агрегации белков», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04. Биохимия

Исследование механизмов агрегации белков представляет собой важную задачу фундаментальной науки и является перспективным направлением современной биотехнологии и медицинской биохимии. При стрессовых воздействиях различной природы (повышение температуры, изменение рН, механический стресс), а также в случае мутаций, влияющих на структуру белка, образуются интермедиаты, склонные к агрегации. Агрегация белков становится значительной проблемой при получении рекомбинантных белков, разработке лекарственных препаратов белковой природы и лежит в основе «конформационных заболеваний», которые

вызываются накоплением белковых агрегатов в клетках. Агрегацию белков в клетках предотвращают молекулярные шапероны, к которым относят белки нескольких различных классов. Молекулярные шапероны могут способствовать приобретению белками нативной структуры, а также предотвращать агрегацию денатурированных белковых молекул и накопление агрегированных форм белков, что приводит к гибели клеток и развитию «конформационных заболеваний». Кроме того, на стабильность белков и их способность к агрегации могут оказывать влияние различные низкомолекулярные соединения – аминокислоты, сахара, полиамины. Эти соединения получили общее название «химические шапероны» и часто применяются в биотехнологии для предотвращения агрегации белков при выделении и очистке белков. Таким образом, изучение механизмов действия белковых молекулярных шаперонов и химических шаперонов, количественная оценка их антиагрегационной активности и поиск агентов, эффективно подавляющих агрегацию белков, являются актуальными задачами современной биохимии. Для выполнения этих задач необходимо понимание механизмов агрегации белков как в клетках, так и в модельных тест-системах, предназначенных для изучения агрегации.

Работа поддержана грантами РФФИ (11-04-00932-а, 11-04-01271-а, 12-04-00545-а, 14-04-01530-а), Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума Российской академии наук, Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракт № П1356).

В диссертационной работе В.А. Борзовой подробно изложены и обоснованы, приемы разработанные диссертантом анализа кинетики агрегации модельных белков и подходы к количественной оценке антиагрегационной активности белковых и химических шаперонов. В качестве меры антиагрегационной активности для шаперонов белковой природы рекомендовано использовать адсорбционную емкость (AC_0) шаперона по отношению к белку-мишени, а химических шаперонов -

концентрацию полунасыщения ($[L]_{0,5}$). Предложена классификация тест-систем в соответствии с кинетическим режимом процесса агрегации и природой скорость-лимитирующей стадии.

Впервые установлен механизм тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА) – одного из распространенных белков-мишеней, используемых для изучения агрегации в модельных системах, – при нейтральных значениях pH. Показано, что тепловая денатурация БСА приводит к образованию форм белка, различающихся по способности к агрегации: высокорекреационноспособной формы, которая быстро агрегирует без накопления в растворе и формирует первичные агрегаты, и низкорекреационноспособной формы, которая вовлекается в процесс агрегации путем присоединения к первичным агрегатам с образованием вторичных агрегатов. Низкорекреационноспособная форма также способна формировать стабильные агрегаты небольшого размера. Дальнейшая агрегация протекает путем слипания вторичных агрегатов. Агрегаты БСА, полученные на всех стадиях процесса агрегации, охарактеризованы с помощью широкого спектра современных физико-химических методов. Кроме того, установлен кинетический режим тепловой агрегации БСА при 70° С и показана возможность создания тест-системы на основе тепловой агрегации БСА при данной температуре. В тест-системе данного типа скорость-лимитирующей стадией является стадия агрегации денатурированных молекул белка, что позволяет оценивать эффект антиагрегационных агентов непосредственно на стадию агрегации денатурированных молекул белка. Изучено влияние аргинина и его производных – аргининамида и этилового эфира аргинина на тепловую агрегацию БСА в описанной тест-системе. Показано, что антиагрегационное действие этих соединений реализуется за счет изменения механизма процесса агрегации и кинетического режима агрегации. В литературе содержатся данные о том, что при определенных условиях аргинин способен ускорять агрегацию белков. В диссертационной работе представлены интересные результаты, указывающие на то, что этот эффект

является кажущимся и связан с увеличением размера агрегатов, образующихся на начальной стадии процесса тепловой агрегации БСА, а не с повышением скорости процесса агрегации.

Детально изучена кинетика агрегации БСА, индуцированной дитиотрептолом (ДТТ). Тест-система на основе индуцированной ДТТ агрегации БСА широко используется для изучения агрегации белков и изучения активности белковых и химических шаперонов. Впервые установлен кинетический режим ДТТ-индуцированной агрегации БСА и показано, что порядок агрегации по белку равен единице. Это означает, что в данной тест-системе скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является стадия денатурации молекул белка. Таким образом, в тест-системе на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА можно оценить влияние антиагрегационных агентов на стабильность белка-мишени. Определена антиагрегационная активность аргинина, его производных (аргининамида и этилового эфира аргинина) и пролина с использованием теоретических подходов, разработанных автором диссертации. Показано, что наиболее высокой антиагрегационной активностью обладает этиловый эфир аргинина (концентрация полунасыщения $[L]_{0,5}$ составила 106 мМ). Антиагрегационный эффект изученных агентов реализуется, как предполагается, путем образования кластеров аргинина и его производных на поверхности белка, на что указывает кооперативный характер зависимостей относительной скорости агрегации от концентрации химических шаперонов. Показано, что в тест-системе на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА в присутствии аргинина смены кинетического режима не происходит.

С использованием тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА было изучено влияние сшивания глутаровым альдегидом на антиагрегационную активность малого белка теплового шока α -кристаллина. Существующие в литературе данные о влиянии сшивания на активность α -кристаллина противоречивы, поэтому строгая количественная характеристика подавления агрегации нативным и сшитым α -кристаллином

представляет особый интерес. Для количественной оценки антиагрегационной активности применялись методы, разработанные автором диссертации. Показано, что при сшивании антиагрегационная активность α -кристаллина снижается в 12 раз, из них на долю денатурации α -кристаллина в процессе сшивания приходится снижение антиагрегационной активности в 6 раз, а на долю непосредственного сшивания мономеров в составе олигомера – снижение антиагрегационной активности в 2 раза.

В работе установлены новые закономерности агрегации в тест-системе на основе ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина. В научной литературе предложено уравнение, связывающее константу скорости агрегации и длительность лаг-периода для амилоидной фибрилляции. Автором диссертации проведена успешная работа по установлению подобной закономерности для аморфной агрегации белков на примере α -лактальбумина. Показано, что в случае ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина длительность лаг-периода имеет предельное минимальное значение при высоких концентрациях белка, существование которого связано, по-видимому, со стадиями денатурации белка и нуклеации.

С использованием тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина изучено влияние облучения ультрафиолетовым светом на антиагрегационную активность α -кристаллина. Проведена количественная оценка снижения доли нативного белка и антиагрегационной активности α -кристаллина в зависимости от дозы облучения. Установлено, что основным фактором, вызывающим снижение шапероноподобной активности α -кристаллина является денатурация молекул белка при облучении. Дополнительным фактором, проводящим к снижению антиагрегационной активности, является сшивание мономеров α -кристаллина внутри олигомера.

Заключительная часть диссертации В.А. Борзовой посвящена анализу влияния специфических лигандов на тепловую агрегацию глутаматдегидрогеназы из печени быка в режиме нагревания с постоянной

скоростью. Тест-системы с подобным режимом агрегации также получили широкое использование при анализе термостабильности белков. Автором диссертации предложен новый способ анализа получаемых кинетических кривых, более корректный по сравнению с методами, описываемыми в литературе, и состоящий в определении скорости агрегации по начальным участкам кинетических кривых. Продемонстрирована применимость этого подхода на примере влияния лигандов на тепловую агрегацию глутаматдегидрогеназы. Результаты согласуются с данными по термостабильности фермента, полученными методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Ценность представленной работы обусловлена также тем, что в ней намечается перспективное направление дальнейших исследований. Предлагаемые методы анализа могут служить для изучения механизмов и кинетики агрегации других белков, в том числе имеющих значение для биотехнологии и медицины. Результаты диссертационной работы, в особенности предлагаемые методы количественной оценки антиагрегационной активности, могут быть использованы при поиске и разработке новых антиагрегационных агентов в биотехнологии, а также при создании белковых препаратов медицинского назначения.

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, она изложена на 181 странице и иллюстрирована 83 рисунками. Обзор литературы посвящен факторам, вызывающим агрегацию белков, моделям агрегации и классификации агрегатов, основным физико-химическим характеристикам, функциям и особенностям денатурации и агрегации использованных в работе белков-мишеней и белкового шаперона α -кристаллина, свойствам и применению химических шаперонов и современным представлениям о механизмах функционирования белковых и химических шаперонов. Автор проделал большую работу, собрав и обобщив большой массив данных, касающихся предмета исследований. Несомненным достоинством диссертации является цитирование автором как

основополагающих, так и современных работ (356 ссылок), к сожалению, русскоязычная литература приведена в конце списка, а не в начале списка литературы. Обзор хорошо иллюстрирован, что позволяет без труда ориентироваться в проблеме.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные автором современные методы исследования, успешное сочетание которых является важной особенностью данной работы. В разделе «Результаты и их обсуждение» излагаются разработанные при выполнении работы методы анализа кинетики агрегации и количественной оценки антиагрегационной активности химических и белковых шаперонов. Подробно рассматриваются механизмы и кинетика агрегации модельных белковых субстратов в отсутствие или в присутствии эффекторов – α -кристаллина и химических шаперонов, изученные методами фракционирования в поле асимметричного потока и динамического светорассеяния. Проведены количественная оценка антиагрегационной активности α -кристаллина и влияния на антиагрегационную активность сшивания глутаровым альдегидом и облучения ультрафиолетовым светом. Проведена количественная оценка и сопоставление антиагрегационной активности пролина, аргинина и его производных (аргининамида и этилового эфира аргинина). Предложен новый подход к анализу влияния различных соединений на агрегацию белка в режиме нагревания с постоянной скоростью. Данный подход апробирован на примере специфических лигандов глутаматдегидрогеназы из печени быка.

Научно-практическая ценность данной работы состоит в том, что разработанные методы анализа кинетики агрегации могут быть использованы для решения фундаментальных и прикладных задач, связанных с установлением механизмов агрегации белков и механизмов подавления агрегации агентами различной природы. Кроме того, предложенные методы количественной оценки антиагрегационной активности могут найти применение при поиске соединений, эффективно подавляющих агрегацию белков в биотехнологии и медицине, а также при изучении влияния

различных факторов на активность молекулярных шаперонов белковой природы.

Результаты диссертационной работы Борзовой В.А. могут быть использованы в исследованиях, проводимых в Учреждениях Российской академии наук – Институте биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», на Биологическом и Химическом факультетах и в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, в Институте теоретической и экспериментальной биофизики, а также при чтении курсов лекций по биохимии, биофизике и молекулярной биологии.

При общей положительной оценке этой интересной работы, необходимо отметить что, соискателю, следовало бы, уделить больше внимания исследованиям отечественных ученых кинетических и морфологических особенностях механизмов агрегации белков. Во введении диссертации и в автореферате, согласно ГОСТ Р. 7.0.11. — 2011 следовало бы добавить пункт – степень разработанности темы.

В рамках поставленных задач диссертацию Борзовой В.А. можно считать завершенным исследованием. По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе 5 статей в ведущих международных журналах. Выводы, сделанные автором, представляются вполне обоснованными и не вызывают возражений, а содержание автореферата и опубликованных статей адекватно отражает основные положения работы. Полученные данные хорошо документированы и их достоверность не вызывает сомнений.

Таким образом, по уровню научной значимости полученных результатов, по их новизне и оригинальности диссертационная работа «Механизмы защитного действия шаперонов при агрегации белков», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям положения 9 – «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.

Отзыв заслушан и одобрен на заседании кафедры биохимии РУДН 19 мая 2016 г. Протокол № 9 от 19.05.2016 г.

Подпись составившего отзыв
к.б.н., 03.01.04 Биохимия, доцент

Рыскина Е.А.

Заведующий кафедрой биохимии
им. академика Т.Т. Березова МИ РУДН
д.б.н., профессор

Н.Н. Чернов

Директор Медицинского института РУДН
д.м.н.



А.Ю. Абрамов

ФГАОУ ВО «РУДН»

Адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6,

Тел. (495) 433-53-00, e-mail: rector@rudn.ru