

ОТЗЫВ

**официального оппонента о диссертации Валиуллиной Юлии Анатольевны
«Межмолекулярные взаимодействия, структура и активность сериновых протеаз в
комплексах с амфифильными соединениями»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.02 – биофизика**

Кандидатская диссертация Ю.А. Валиуллиной посвящена изучению механизма изменения каталитической активности белков – сериновых протеаз в водных смесях с амфифильными лигандами (поверхностно-активными веществами, ПАВ) способными к комплексообразованию. В качестве белков использованы: трипсин и α -химотрипсин; в качестве амфифильных лигандов – анионное ПАВ: бис(2-этилгексил) сульфосукцинат натрия (АОТ), катионное ПАВ: бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ) и алкилрезорцины с разной длиной алкильного радикала. Используются также алкиламмонийные геминальные поверхностно-активные вещества (ГПАВ) – с метильным заместителем в головной группе (n–b–n) и с гидроксипропиловым заместителем в головной группе (16–m–16).

Обратимся к оценке *актуальности избранной темы*.

Являясь полиамфифилами и обладая наличием полярных и неполярных групп в составе макромолекул, белки характеризуются ярко выраженной способностью к комплексообразованию с различными веществами. В ряду таких веществ амфифильные соединения, и в первую очередь ПАВ различной природы, занимают особое место, благодаря широкому использованию комплексов белок/ПАВ для решения различных практических задач в молекулярной биологии, в пищевых, фармакологических и косметических технологиях, в пролонгированной доставке лекарственных средств, при создании каталитических систем и биологических сенсоров и др.

В последние годы активно развивается мицеллярная энзимология — научное направление, в рамках которого исследуются характеристики и поведение ферментов, включённых в агрегаты (мицеллы) ПАВ различного состава и структуры. Подобные системы, моделируя биомембранное окружение ферментов, позволяют выявить механизм ферментативного катализа, не обнаруживаемый в водных растворах. Изучение таких систем позволяет находить пути регулирования третичной (и вторичной) структуры и, следовательно, активности ферментов мономерами ПАВ и мицеллярным окружением, моделирующим биомембрану.

Так, в литературе показано, что мицеллы ПАВ могут являться регулятором супрамолекулярной структуры и каталитической активности ферментов (белков) сольбилизованных в мицеллярных системах. Однако молекулярные механизмы, определяющие влияние амфифильных комплексообразующих лигандов на активность ферментов, требуют дальнейших детальных исследований.

В сущности, этому и посвящена и диссертация Ю.А. Валиуллиной. Именно вопрос оценки каталитической активности сериновых протеаз – трипсина и α -химотрипсина, степени доступности субстрата к активному центру фермента в присутствии амфифильных ПАВ (мономеров и мицеллярных ассоциатов) при комплексообразовании рассмотрен в диссертации Ю.А. Валиуллиной.

При этом смысл работы состоит в попытке объяснить механизм регуляторного действия амфифильных соединений, заключающийся в создании микрогетерогенной среды определенного строения, которая регулирует структуру фермента и его каталитическую активность в реакциях гидролиза. Обоснованный выбор типа амфифильных соединений и их концентрации позволяет целенаправленно увеличивать или уменьшать активность сериновых протеаз.

Цель рассматриваемой диссертационной работы состояла в поиске корреляций структура/свойство (активность) для сериновых протеаз при их взаимодействии с низкомолекулярными амфифильными лигандами.

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и выводов, и списка литературы. Вначале работы приведен список сокращений. Содержание работы изложено на 147 страницах, содержит 68 рисунков и 8 таблиц. Библиография включает 191 наименование литературных источников.

Рассмотрим *степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации Ю.А. Валиуллиной, их достоверность и новизну.*

Во-первых, как научное достижение, важное для всей рассматриваемой области, следует выделить разработку общего подхода к регулированию ферментативной активности сериновых протеаз путем введения низкомолекулярных амфифильных соединений (ПАВ различной природы) приводящих к изменению микроокружения фермента и, следовательно, изменению доступности субстрата активному центру белка.

Предложенный подход позволяет прогнозировать кинетику реакций ферментативного гидролиза. Безусловно, это важно, поскольку, во-первых, подводит общую основу для установления механизма действия фермента и в составе комплекса с белок/ПАВ, и в мицеллярном окружении, а во-вторых, позволяет обосновать технологическую целесообразность применения тех или иных добавок ПАВ необходимых концентраций в реальных системах для получения необходимой скорости ферментативной реакции.

Во-вторых, автор предлагает и обосновывает состав и строение обратных микроэмульсионных систем на основе анионного ПАВ – АОТ и катионного ПАВ – ЦТАБ. Подобные системы, создавая микроэмульсионную матрицу, используются для изменения каталитической активности трипсина и α -химотрипсина. Автор показывает, что изменение свойств подобной реакционной среды и, как следствие, модификация структуры ферментов возможно использованием со-ПАВ – предельных спиртов нормального строения. Здесь есть один принципиальный вопрос, на который в работе обращается особое внимание, а именно учет концентрации спирта, повышение которой вызывает конформационные изменения макромолекул белка – изменение вторичной и третичной структуры (по данным методов ИК-спектроскопии и флуоресценции).

Автор показывает также, что увеличение концентрации спирта (полярного компонента) в системе приводит к перераспределению субстрата между жидкими фазами и перехода субстрата в органическую фазу. При этом размеры мицеллярных ассоциатов уменьшаются. Это приводит к уменьшению доступности субстрата для фермента, находящегося в водной фазе, и ингибированию ферментативной реакции.

В-третьих, в диссертационной работе предложены механизмы изменения каталитической активности ферментов путем подбора вида геминальных ПАВ (ГПАВ) и

использования необходимых концентраций, обеспечивающих существование ПАВ либо в мономерной форме, либо в форме мицеллярных агрегатов.

Автор впервые показал специфичность их действия на каталитическую активность ферментов. Усиливающее действие ГПАВ с метильными заместителями в головных группах связано с высокой способностью мономеров (при концентрациях ниже ККМ) к комплексообразованию с белком, вызывающему конформационные изменения макромолекул. В то же время ГПАВ при концентрациях выше ККМ провоцирует перераспределение субстрата между водной фазой и мицеллами ГПАВ, что приводит к ингибированию фермента. Автор показал необходимость учитывать концентрацию и строение ГПАВ, в частности длину углеводородного радикала. При использовании гидроксилсодержащих ГПАВ показано, что использование образцов с большими спейсерными фрагментами приводит к росту ферментативной активности α -химотрипсина.

Впервые для подобных систем проведено моделирование комплекса белок/ПАВ методом молекулярного докинга, позволяющего рассчитать энергетические параметры комплексообразования и проинтерпретировать возможную локализацию молекул ПАВ на поверхности макромолекулы белка.

В-четвертых, в диссертационной работе Ю.А. Валиуллиной показано ингибирующее действие алкилоксибензолов (АОБ) по отношению к сериновым протеазам. Автор высказывает предположение, что одним из механизмов действия алкилоксибензолов, как индукторов анабиоза, является блокировка активного центра ферментов. Подобное предположение подтверждается моделированием комплексообразования АОБ с трипсином и α -химотрипсином методом молекулярного докинга.

В-пятых, положительные впечатления производит продуманное комплексное использование современных методов исследования физико-химических свойств изучаемых систем, включая кинетические методы исследования, динамическое рассеяние света, флуоресценцию, ИК-спектроскопию, ЯМР и метод молекулярного докинга с использованием компьютерной программы со специальным алгоритмом.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов работы определяются использованием комплекса современных физико-химических методов, позволивших получить набор параметров, характеризующих кинетические, структурные и биофизические свойства ферментов – трипсина и α -химотрипсина в водных и микроэмульсионных системах, содержащих белок и амфифильные лиганды (ПАВ), и взаимосогласованностью результатов, полученных для исследованных систем.

Диссертация Ю.А. Валиуллиной и ее автореферат хорошо оформлены. Графический и табличный материал в полной мере иллюстрирует теоретические и методические положения диссертации и полученные в ней экспериментальные результаты.

Таким образом, работа содержит обширный круг новых научных результатов, которые обосновывают представление диссертация по специальности 03.01.02 – биофизика. Диссертационная работа явно соответствует паспорту специальности 03.01.02. Она посвящена изучению биофизических свойств белка и биофизике сложных микрогетерогенных систем, включающих белки и различные амфифильные вещества, способные к взаимодействию с белком, в том числе к комплексообразованию. Исследования проведены в области

регулирования структуры и функции ферментов, в том числе мицеллярной матрицей (мицеллами) — фрагментом биомембран.

Работа проводилась в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН (темы № ГР №0120.0 803026 и № ГР 0120.0 1357054), частично поддержана грантами РФФИ (проекты № 05-03-33110-а, № 09-03-00778-а), а также грантом Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология»).

Вместе с тем, по диссертации можно высказать следующие замечания.

1. Полученные экспериментальные результаты и их интерпретация, связанная с изменением третичной и вторичной структуры белка при увеличении концентрации спирта в микроэмульсионной системе на основе ПАВ достаточно убедительны. Но в то же время вопрос о возможном комплексообразовании белков с анионным АОТ и/или катионным ЦТАБ и их влиянием на структуру и активность фермента в диссертации не обсуждается.

2. Субстраты БТНА и БАПНА, которые являются гидрофобными соединениями, хорошо солюбилизируются в прямых мицеллярных дисперсиях ПАВ (как показано в Главе 4). Как автор может объяснить присутствие этих гидрофобных субстратов в водной дисперсной фазе обращенных микроэмульсионных систем на основе АОТ и ЦТАБ и спирта как со-ПАВ (Глава 3)?

3. Предлагаемые и обсуждаемые в работе модели комплексов фермент/ПАВ являются результатом взаимодействия макромолекулы фермента с мономером ПАВ, то есть относятся к системам, в которых концентрация ПАВ ниже ККМ. Как можно представить строение комплекса в случае, когда в системе присутствуют мицеллы ПАВ (при концентрациях ПАВ выше ККМ) и объяснить в этом случае действие ПАВ?

Несколько замечаний касаются методической части (Глава II) и оформления диссертации.

4. Было бы желательно в методической части более подробно описать все использованные вещества с указанием основных свойств, например, критических концентраций мицеллообразования для амфифильных молекул алкилоксибензолов.

5. Не описано как вычисляется относительная начальная скорость реакции.

6. В литературном обзоре (стр. 28 диссертации) отмечено, что геминальные ПАВ обозначаются как *n-m-n*. Однако в обсуждаемых результатах автор, к сожалению, не использует этот информативный способ обозначения используемых ГПАВ (например, табл. 3 на стр. 82, табл. 4 на стр. 98 диссертации и т.п.).

7. Используемые автором термины «немицеллированное ПАВ» и «мицеллированное ПАВ» не совсем удачны. В первом случае речь идет о мономерах ПАВ при концентрациях ПАВ ниже ККМ, во втором – о ПАВ в составе мицелл при концентрациях ПАВ выше ККМ.

Перечисленные замечания не снижают общего, весьма благоприятного впечатления от диссертационной работы Ю.А. Валиуллиной, являющейся законченным исследованием, имеющим научное и прикладное значение.

Результаты диссертации опубликованы в 4 статьях в журналах из списка ВАК и в 6 статьях в сборниках, представлены на российских и международных конференциях, по результатам которых опубликовано 18 работ в сборниках тезисов конференций. Автореферат диссертации адекватно и полно отражает ее содержание.

Очевидно, что диссертация Ю.А. Валиуллиной написана ею самой на основании собственных исследований, работа достоверно отражает вклад автора в науку и содержит совокупность новых научных результатов, выдвигаемых автором для публичной защиты.

Резюмируя сказанное в свете требований ВАК Минобрнауки РФ к кандидатским диссертациям, следует оценить исследования Ю.А. Валиуллиной как научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи целенаправленного регулирования ферментативной активности сериновых протеаз при действии амфифильных соединений (ПАВ разной природы), имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний – биофизики.

Диссертационная работа Ю.А. Валиуллиной «Межмолекулярные взаимодействия, структура и активность сериновых протеаз в комплексах с амфифильными соединениями» представляет собой законченное научное исследование и соответствует критериям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней. Автор диссертационной работы – Юлия Анатольевна Валиуллина заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент

Доктор химических наук, профессор,
заведующая кафедрой химии ФГБОУ ВО «Мурманский
государственный технический университет»



С.Р. Деркач

ФГБОУ ВО «Мурманский государственный технический университет» (МГТУ)
Мурманск 183010, ул. Спортивная, 13
Тел.: +7 8152 403330
e-mail: derkachsr@mstu.edu.ru

Подпись доктора химических наук, профессора Деркач Светланы Ростиславовны подтверждаю,

Ученый секретарь Ученого совета МГТУ



Т.В. Провина