

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Юлии Анатольевны Валиуллиной «МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, СТРУКТУРА И АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В КОМПЛЕКСАХ С АМФИФИЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Актуальность темы диссертационной работы Ю.А. Валиуллиной не вызывает никаких сомнений, поскольку затрагивает важные аспекты функционирования белков как в естественных условиях, так и в различных искусственных системах. Очевидно, что «водная энзимология», очень много давшая для понимания функционирования ферментов, имеет определенные ограничения, поскольку, как правило, не учитывает взаимодействие белков с амфифильными соединениями. А ведь именно в таком окружении функционируют белки в клетке. Кроме того, невозможно представить себе создание современных белковых препаратов, предназначенных для медицинских или биотехнологических целей без адекватного понимания процессов, происходящих при взаимодействии белков с различными компонентами (полимерами, поверхностно-активными веществами, малыми молекулами и т.д.). По указанным причинам представленная диссертационная работа является актуальным и важным исследованием.

Диссертация Ю.А. Валиуллиной изложена на 147 стр. и состоит следующих 5 глав (обзор литературы, объекты и методы исследования и 3 экспериментальные главы, описывающие полученные результаты) а также введения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы содержит 191 ссылку (45 из них – на отечественные издания). Работа хорошо иллюстрирована 68 рисунками и 8 таблицами.

Обзор литературы написан хорошо и позволяет оценить вклад диссертанта в исследуемую проблему. В обзоре литературы достаточно подробно описаны структура и функции сериновых протеиназ, являющихся объектов данной работы, приведены сведения о различных супрамолекулярных системах на основе амфифильных соединений, а также дана информация о некоторых свойствах сериновых протеиназ в системах, полученных на основе амфифильных соединений. Большим достоинством обзора является присутствие довольно

большого числа ссылок на работы отечественных исследователей, в том числе и на достаточно старые. Это показывает хорошее знакомство автора с проблемой, которое не ограничилось беглым обзором последних статей из доступных баз данных. Безусловно, полезно и подробное описание очень интересного класса соединений – геминальных поверхностно-активных веществ. Это относительно новая группа амфифильных соединений, позволяющих создавать необычные комплексы, пригодные для включения в их состав белков.

По обзору литературы есть несколько небольших замечаний. Не стоило брать картинки из учебников (рис. 3), тем более не очень хорошего качества. Надмолекулярные ансамбли были известны и до работ Б.Ф. Поглазова и Б.И. Курганова, при всем к ним уважении. Стабилизация ферментов полиэлектролитами была показана до работ Е.В. Кудряшовой, которая показала этот эффект на примере химотрипсина (стр. 21). Тем более, что бывает не только стабилизация (стр. 22), но и дестабилизация белков при взаимодействии с полиэлектролитами. Мне кажется, что на работы группы А.В. Левашова можно было бы дать больше ссылок, учитывая их вклад в развитие мицеллярной энзимологии. Но в целом обзор, конечно, хороший и отличается от принятой в последние годы моды, ссылаться только на самые последние статьи без учета истории вопроса.

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. Спектр физических методов исследования довольно широк, что вполне вписывается в выполнение работы по специальности «Биофизика». А вот такие хорошо известные кинетические методы, как определение активности и K_m , а также определение рН-зависимости активности протеиназ в исследуемых системах, не стоило описывать столь подробно, да еще и с рисунками. Возможно, это было сделано «в знак уважения» к биохимическим аспектам в этой биофизической работе.

В трех экспериментальных разделах понятно и логично изложена полученная автором информация. Автором было проведено подробное изучение влияния разных амфифильных соединений, отличающихся по структуре, строению и заряду головных групп, на активность двух сериновых протеаз – трипсина и альфа-химотрипсина. В работе были применены спектральные

методы (флуоресцентный анализ и ИК- спектроскопия), динамическое лазерное светорассеяние, ЯМР-самодиффузия и кинетический анализ. Эти подходы позволили оценить не только изменение каталитических параметров протеиназ, но и различные свойства как ферментов, так и супрамолекулярных структур в целом. Так было установлено, что изменение каталитической активности сериновых протеиназ в присутствии нормальных алифатических спиртов связано не только с модификацией структуры ферментов, но и с изменениями свойств среды из-за уменьшения размеров мицеллярных агрегатов и усилением влияния зарядов поверхности раздела фаз. Наиболее интересен и оригинален раздел, касающийся изучения взаимодействия трипсина и α -химотрипсина с геминальными катионными алкиламмонийными поверхностно-активными соединениями. Эти соединения имеют довольно необычную структуру, существенно отличающуюся от обычных, достаточно хорошо исследованных амфифильных соединений. Возможность регулирования размеров углеводородных радикалов, а также длины сшивок между полярными головными группами, позволяет на их основе создавать новые супрамолекулярные системы для модификации параметров целевых белков. Автором были выявлены факторы, определяющие специфичность действия геминальных поверхностно-активных соединений на каталитическую активность ферментов. Было показано, что влияние этих соединений на ферменты зависит от локализации лиганда на поверхности фермента, а также от изменения солубилизационной емкости растворов различных ПАВ по отношению к субстратам. Оказалось, что, подбирая строение и концентрации катионных геминальных поверхностно-активных соединений, можно регулировать активность сериновых протеаз как в сторону уменьшения, так и существенного увеличения скорости ферментативной реакции. Интересны и результаты молекулярного докинга, показавшие, что существует специфика связывания различных амфифильных соединений с исследованными протеиназами. Высказано предположение, что амфифильные соединения оказывают влияние на структуру ферментов и на всю реакционную среду в целом, что может приводить к блокированию взаимодействия фермент-субстрат.

Несомненно украшает работу предложенная модель регуляции активности сериновых протеаз в растворах амфифильных соединений, включающая изменение микроокружения фермента и субстрата, а также учитывающая доступность субстрата для активного центра фермента.

Очень полезна и информативна схема на рисунке 68. По данному разделу есть несколько небольших вопросов и замечаний. В этом разделе несколько раз встречается фраза «Следовательно, н-бутанол может сложным образом распределяться между водным ядром обращенных мицелл, их углеводородной оболочкой и объемной органической фазой» (например, стр. 72). Мне кажется, что выражение «сложным образом» мало что дает для лучшего понимания описываемых процессов. На стр. 73 следовало бы четко написать «бутанол выводит воду из мицелл» без витиеватых выражений. Автор использует то термин «дисперсионная фаза», то «органическая фаза», что затрудняет чтение. На рис. 34 изображены обращенные мицеллы, а написано – «мицеллы». При описании геминальных поверхностно-активных веществ в разделе «Результаты» следовало бы еще раз четко пояснить, что означают символы «m» и «n», чтобы не приходилось обращаться к соответствующему разделу «Обзора литературы». Приведенная на стр. 77 фраза «При этом средний гидродинамический диаметр комплексов ПАВ-белок на 15-25% превышает размер мицелл и размер молекулы белка», не соответствует приведенным на рис. 35 и 36 данным. На рис. 35, вероятно, не во всех случаях приведены данные о размерах именно мицелл. На стр. 115 повтор рассуждений о разложении спектров флуоресценции. Есть несколько неудачных выражений, например, «термостабильные свойства» (стр. 113)

Безусловно, сделанные замечания не умаляют ценности сделанной работы.

Таким образом, можно с уверенностью сказать, что Ю.А. Валиуллиной 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 Юлии Анатольевны Валиуллиной «МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, СТРУКТУРА И АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В КОМПЛЕКСАХ С АМФИФИЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ», 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 – Юлии Анатольевны Валиуллиной заслуживает присуждения искомой степени по специальности: 03.01.02 – «Биофизика».

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают материалы диссертации.

Владимир Израилевич Муронец
доктор биологических наук, профессор,
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

« 29 » _сентября_ 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.И. Скулачев