

"УТВЕРЖДАЮ"

проректор по научной деятельности  
ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский)  
федеральный университет"

д.г.-м.н., профессор Д.К. Нурғалиев

" 9 " 2016 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию 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

Взаимодействие белков с амфифильными соединениями является предметом многолетнего внимания исследователей, поскольку амфифильными свойствами обладают многие природные регуляторные молекулы. Амфифильные соединения находят применение в аналитической молекулярной биологии, в пищевых, фармакологических и косметических производствах, в доставке лекарств, при создании нанокапсул, конструировании каталитических и сенсорных систем. Известно, что свойства белков в комплексах с амфифильными соединениями зависят от таких характеристик этих соединений, как заряд и размер полярной головной группы, длина алифатических радикалов. В диссертационной работе Валиуллиной Ю.А. в качестве представителей белков выбраны сериновые протеазы, катализирующие гидролиз пептидных или эфирных связей. Наличие

разнообразного экспериментального материала по структуре этих белков и кинетике катализируемых ими реакций делает этот класс ферментов удобным объектом для изучения механизмов межмолекулярного взаимодействия, для разработки и тестирования различных моделей, где необходимо получить корреляцию структура-свойство, под которой в настоящей работе рассматривается ферментативная активность.

Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, включающих обзор литературы, описание объектов и методов исследования, изложение и обсуждение результатов, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 191 источник, из них 146 зарубежных. В работе представлено 8 таблиц и 68 рисунков.

В обзоре литературы подробно рассмотрены известные данные, касающиеся структуры и механизма каталитического действия основных представителей сериновых протеаз. Проанализированы сведения о модификации структуры и активности сериновых протеаз низкомолекулярными лигандами, как напрямую в результате молекулярных контактов, так и опосредованно путем модификации свойств микроокружения белка. В достаточной степени подробно рассмотрены афифильные соединения, которые могут использоваться в качестве потенциальных партнеров белков, при образовании супрамолекулярных реакционных комплексов. Представлены основные сведения о свойствах поверхностно-активных веществ (ПАВ), в первую очередь о солубилизации нерастворимых соединений, и о самоорганизации ПАВ (водные мицеллярные растворы и микроэмульсии вода/масло). Рассмотрены свойства сериновых протеаз в супрамолекулярных системах на основе амфифильных соединений. В целом обзор литературы содержит информацию, необходимую для формулировки постановки задачи исследования и обсуждения полученных в работе результатов, и свидетельствует о глубоком понимании диссертантом затронутых вопросов. Очень важно, что обзорная глава завершается формулировкой цели исследования.

Во второй главе "Объекты и методы исследования" подробно описаны использованные в диссертационной работе экспериментальные методы. В этом разделе изложены основные характеристики объектов исследования, детали приготовления образцов для кинетических измерений и для структурных



исследований, а также уточнены особенности этого раздела работы. Производит большое впечатление используемый в работе набор взаимодополняющих методов структурного анализа белков и их комплексов с амфифильными лигандами – метод ЯМР-самодиффузии, динамического светорассеяния, флуоресцентной спектроскопии триптофановых остатков, ИК-спектроскопии. Большое значение для выполнения такой комплексной работы имеет выбор методов. С одной стороны, метод динамического светорассеяния дает информацию о самом комплексе, методы флуоресцентной и ИК-спектроскопии позволили охарактеризовать внутреннюю структуру комплексов. Метод ЯМР-самодиффузии был использован для исследования таких многокомпонентных систем, как микроэмульсии, что позволило определить распределение компонент исследуемых систем между фазами. Очень интересным является использование метода солубилизации. Для систем, которые характеризуются большой микрогетерогенностью структуры и распределением полярных и неполярных областей, важно иметь информацию о возможной локализации участников ферментативных реакций и областей их реакционного контакта. Современные структурные исследования немыслимы без оптимального баланса между прямым экспериментом и математическим моделированием. В рецензируемой работе удачно использован метод молекулярного докинга для моделирования структуры и свойств комплексов белок-лиганд, что позволило получить важную дополнительную информацию о структуре исследуемых комплексов.

В последующих двух главах, насыщенных экспериментальным материалом, Валиуллина Ю.А. подробно рассматривает структурно-функциональную связь исследованных ферментов в системах, принципиально различающихся по своей структурной организации. Сначала, это поведение ферментов в водных ядрах обращенных мицелл, где объемной средой является органическая фаза. Далее, это водные растворы геминальных ПАВ, которые модифицируют и структуру ферментов и условия их реакционного контакта с субстратом. Выбор таких различных систем позволил оценить активность исследованных сериновых протеаз как в водной, так и в органической среде, т.е. в диаметрально противоположных условиях с точки зрения влияния среды на структуру белка.

В пятой главе на наш взгляд, представлены очень интересные результаты по моделированию молекулярного действия амфифильных индукторов анабиоза. Для моделирования регуляторного действия природных амфифильных соединений – регуляторов биохимических процессов, в этом разделе работы был выбран ряд синтетических аналогов микробных низкомолекулярных ауторегуляторов анабиоза - алкилоксибензолов (АОБ). С одной стороны в этой части диссертации автору удалось творчески использовать структурные наработки, полученные в предыдущих главах. А с другой стороны, получены интересные фундаментальные данные о возможном действии анабиотических агентов – по данным автора, они фактически могут на время только блокировать активный центр ферментов, не нарушая кардинально их структуры.

Таким образом, в данной работе проведено комплексное исследование влияния ряда амфифильных соединений, отличающихся по структуре, строению и заряду головных групп на активность классических представителей сериновых протеаз - трипсина и химотрипсина. Результаты использования триптофановой флуоресценции и ИК-спектроскопии позволили оценить структурные изменения, происходящие с белком в растворах ПАВ. Данные по солубилизационной емкости мицеллярных растворов, а также результаты ЯМР-самодиффузии компонент исследуемых систем свидетельствуют о микрогетерогенности реакционных сред с наличием соответствующих механизмов регуляции активности ферментов. Результаты молекулярного докинга показали, что существует специфика связывания различных амфифильных соединений с белковыми макромолекулами. Таким образом, установлено, что амфифильные соединения оказывают влияние на структуру фермента и на всю реакционную среду в целом, включая условия фермент-субстратного взаимодействия.

К наиболее существенным результатам диссертационной работы можно отнести следующие:

- На примере сериновых протеаз предложена схема использования взаимодополняющих методов ферментативной кинетики, ЯМР, динамического светорассеяния, флуоресценции, ИК-спектроскопии и молекулярного докинга для исследования регуляторного действия амфифильных соединений на активность ферментов.



- Установлено, что изменение каталитической активности сериновых протеаз в микроэмульсионной среде связано с модификацией структуры ферментов и свойств реакционной среды присутствующими со-ПАВ - нормальными алифатическими спиртами. В результате их действия уменьшаются размеры мицеллярных агрегатов, усиливается влияние зарядов поверхности раздела фаз, т.е. меняются свойства микроокружения ферментов, а, следовательно, их структура и условия каталитического действия.

- При взаимодействии трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина с геминальными катионными алкиламмонийными поверхностно-активными соединениями впервые установлены факторы, определяющие специфичность их действия на каталитическую активность ферментов. Специфичность определяется: различием в локализации лиганда на поверхности фермента, индуцирующего изменения в его структуре, изменением солубилизационной емкости растворов различных ПАВ по отношению к субстратам и их доступности для ферментативного действия.

Важной частью диссертационной работы Ю.А. Валиуллиной являются моделирование молекулярных механизмов действия индукторов анабиоза. В работе показано, что одни из классических представителей этих функциональных соединений – алкилоксибензолы, уменьшают каталитическую активность трипсина и альфа-химотрипсина, блокируя доступ субстрата к активному центру фермента. Для всех изученных алкилоксибензолов наблюдается высокая вероятность образования комплексов с участием хотя бы одного аминокислотного остатка, входящего в каталитическую триаду сериновых протеаз. Высказано предположение, что одним из механизмов действия алкилоксибензолов, как индукторов анабиоза, является обратимая блокировка активного центра ферментов.

Большой интерес представляет сделанное автором обобщение, а именно, предложенная модель регуляции активности сериновых протеаз в растворах амфифильных соединений, основанная на изменении микроокружения фермента и субстрата и доступности субстрата активному центру фермента.

Завершая анализ диссертационной работы Ю.А. Валиуллиной можно констатировать, что полученные результаты являются новыми и оригинальными. Научные положения работы расширяют и углубляют современные представления о взаимосвязи структуры и функциональной активности ферментов, о роли

модифицирующего действия лигандов и среды функционирования. Работа выполнена на высоком научном уровне. Диссертация тщательно оформлена, выводы полностью обоснованы и базируются на обширном экспериментальном материале.

Вместе с тем рассматриваемая работа не свободна от ряда незначительных недостатков. Например, можно сделать следующее замечание. Коэффициенты распределения солюбилизированного вещества между фазами системы (Р) (стр. 75) определяются не только соотношением растворимостей, но еще и объемами соответствующих фаз. Т.е. нужно оценивать объем мицеллярной фазы, что по-видимому в работе не делалось.

Имеются мелкие погрешности - опечатки и неточности в подписях к рисункам.

Автореферат диссертации по содержанию полностью соответствует диссертации. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в ведущих отечественных журналах и доложены на всероссийских конференциях.

Результаты диссертационной работы Валиуллиной Ю.А. могут быть использованы при выполнении исследований взаимосвязи структуры и функции биомакромолекул, динамики белков в водно-органических средах на биологическом и химическом факультетах, факультете биоинженерии и биоинформатики и факультете наук о материалах Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН и др., а также при чтении лекций в высших учебных заведениях химического и биологического профиля.

По актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений, достоверности полученных данных и выводов, объёму, новизне, теоретической и практической значимости исследований представленная диссертация соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор, Валиуллина Юлия Анатольевна,



заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры биохимии и биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, протокол № 1 от 7 сентября 2016 г.

Зав. кафедрой

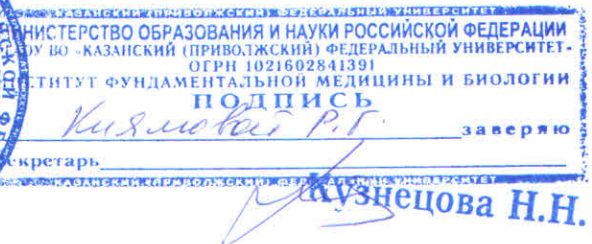
биохимии и биотехнологии ИФМиБ КФУ

д.б.н, с.н.с.



*Р. Г. Киямова*

Р. Г. Киямова



Киямова Рамзия Галлямовна, доктор биологических наук (03.01.03 - Молекулярная биология), с.н.с. Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"  
420008, Россия, РТ, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18,  
тел.: (843)233-71-09, e-mail: public.mail@kpfu.ru, сайт: kpfu.ru