

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 23 июня 2016 г. № 10 о присуждении
Борзовой Вере Александровне, гражданство Российская Федерация, учёной степени
кандидата биологических наук.

Диссертация «Механизмы защитного действия шаперонов при агрегации белков»
по специальности 03.01.04 Биохимия, принята к защите 21 апреля 2016 г. (протокол № 6)
диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного
учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33,
строение 2. Совет утверждён Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ,
приказ № 2249-1602 от 16.11.2007г. с учётом изменений в составе Совета в соответствии с
приказом Минобрнауки России от 13.02.2013г. №74/нк и от 10.02.2014г. №55/нк и с
учётом переименования Совета от 30.09.2015г. № 1166/нк.

Соискатель Борзова Вера Александровна, 1987 года рождения, в июне 2009 г.
окончила Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет по специальности «биохимия». В октябре 2009 г. поступила в
очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, где проходила обучение по
октябрь 2012 г. Диссертационную работу соискатель Борзова В.А. выполняла в
лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители - Маркосян Кира Андреевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» и Курганов Борис Иванович, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Муронец Владимир Израилевич, доктор биологических наук, профессор, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», заведующий Отделом биохимии животной клетки;

Векшин Николай Лазаревич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории внутриклеточной сигнализации, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует требованиям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утверждённом Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области биохимии. Так, доктор биологических наук, профессор Муронец Владимир Израилевич известен своими исследованиями в области стабильности структуры белков и механизмов функционирования белков-шаперонов.

Среди интересов другого оппонента, доктора биологических наук Векшина Николая Лазаревича, лежат исследования стабилизации белков низкомолекулярными соединениями, а также агрегации белков и молекулярных шаперонов. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в высоко цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что на кафедре биохимии медицинского института Российского университета дружбы народов проводятся исследования белок-белковых взаимодействий и влияния на эти взаимодействия низкомолекулярных соединений, связанные с тематикой представленной диссертационной работы, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 статьях рецензируемых научных изданий, которые удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842:

1. Eronina T., **Borzova V.**, Maloletkina O., Kleymenov S., Asryants R., Markossian K., Kurganov B. (2011) A protein aggregation based test for screening of the agents affecting thermostability of proteins. PLoS One. V. 6. No. 7. e22154.
2. **Borzova V.A.**, Markossian K.A., Kara D.A., Chebotareva N.A., Makeeva V.F., Poliansky N.B., Muranov K.O., Kurganov B.I. (2013) Quantification of anti-aggregation activity of chaperones: a test-system based on dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin. PLoS One. V. 8. No. 9. e74367.
3. **Borzova V.A.**, Markossian K.A., Kurganov B.I. (2014) Relationship between the initial rate of protein aggregation and the lag period for amorphous aggregation. International Journal of Biological Macromolecules. V. 68. P. 144–150.
4. **Borzova V.A.**, Markossian K.A., Muranov K.O., Polyansky N.B., Kleymenov S.Yu., Kurganov B.I. (2015) Quantification of anti-aggregation activity of UV-irradiated alpha-crystallin. International Journal of Biological Macromolecules. V. 73. P. 84-91.
5. **Borzova V.A.**, Markossian K.A., Kara D.A., Kurganov B.I. (2015) Kinetic regime of dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin. International Journal of Biological Macromolecules. V. 80. P. 130-138.

Результаты работы были также представлены на 3 международных и 3 всероссийских конференциях:

V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011), IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); VI Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Уфа, 2013), 38th FEBS Congress and YSF 2013 (Saint Petersburg, 2013), International Conference on Bioorganic Chemistry, Biotechnology and Bionanotechnology dedicated to the 55th Anniversary of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Moscow, 2014), 6th International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques (Valencia, 2015).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Муронца В.И. (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- Автором хорошо и подробно, возможно, что даже слишком подробно, описаны основные объекты исследования – белки, в том числе и обладающие шапероноподобной активностью, а также «химические шапероны». А вот проблеме защитного действия шаперонов, их функциям, агрегации белков уделено меньше внимания. Нет четкого разделения шаперонов и белков, обладающих шапероноподобной активностью. Понятно, что шапероны и шаперонины лежат за рамками данного исследования, но, по крайней мере, четко разграничить сферы интересов автора было необходимо. Только на 60-ой странице автор начинает использовать термин «шапероно-подобная» активность. А ведь очевидно, что все кинетические подходы, которые применил автор, могут не работать, например, в случае сложных энергозависимых шаперонов. По этой же причине название работы не совсем соответствует ее содержанию, поскольку «настоящие» шапероны не были исследованы в работе. На мой взгляд, термин «химические шапероны» - это дань моде, зародившейся еще лет 20 назад. На самом деле это просто химические соединения, обладающие определенной антиагрегационной активностью, а совсем не «помощники» в правильном сворачивании белков, как предполагалось при первоначальном введении термина «шаперон». В целом биологические аспекты агрегации белков и роли шаперонов в этом процессе освещены неполно, а ведь диссертация по биологическим наукам.

- Из мелких замечаний. Нет в русском языке «болезни Хантингтона» - есть «болезнь Гентингтона». Если автору больше нравится английское произношение, то и следовало бы писать и «болезнь Альцхаймера». Ссылки на русские работы в списке литературы должны идти перед ссылками на английскими (в списке сокращений, кстати, именно так и сделано). Так что и здесь надо было быть более последовательной.
- Однако мне кажется, что для традиционных методов, которые уже много лет используются в данной лаборатории, не было необходимости столь подробного описания, включая теоретическую часть. Кстати, если все эти разделы были заново написаны автором, то просто жаль его времени, а если скопированы из работ предшественников, то есть шанс получить упреки в плагиате. Совершенно необоснованные на взгляд специалистов, но приятные для борцов с плагиатом. А вот новый, по крайней мере для меня, метод «фракционирования в поле асимметричного потока» украсили бы фотографии прибора и большее количество технических деталей.
- На стр. 70 и далее подробно описаны опыты по проведению ДСК после предварительного прогревания БСА в течение разных интервалов времени. Я не очень понял смысл этого исследования. По исходной кривой ДСК можно сделать сходные выводы, может быть не столь точные количественно. В этом и прелесть ДСК, что не надо греть белок при одной температуре в течение разных интервалов времени, а сразу получить информацию, что, например, при постепенном нагреве до 65 градусов половина белка денатурирует. Похожий результат и был получен более сложным путем.
- На стр. 78 следовало бы пояснить фразу о «перестройке дисульфидных связей». В каких условиях она происходит? Хотелось бы более четкого представления о природе «низкорекционноспособной развернутой формы». Что же это такое и в чем ее отличия от «высокорекционноспособной развернутой формы»?
- Стр. 89, рис. 3.18. Вопрос по рисунку Б. Структура белковых агрегатов резко изменяется по сравнению с рис. А, но есть ли это следствие постепенного изменения агрегационного состояния белка или присутствия вируса табачной мозаики – неясно.
- Стр. 94-95: каковы причины столь резкого уменьшения дзета-потенциала? Может быть, вообще какие-то формы белка с существенными пост-трансляционными модификациями? В опытах по индукции агрегации ДТТ автор еще и нагревает белок. Зачем это нужно и что будет без нагрева? Возможно, что только нагретый и

немного развернутый белок обладает доступными для восстановления дисульфидными связями? В целом надо было бы подробнее обсудить вопрос о дисульфидных связях БСА. Какие именно дисульфидные связи восстанавливаются? Как они расположены в молекуле белка (например, по данным кристаллографии)? Возможно ли замыкание новых дисульфидных связей, особенно при длительной инкубации по мере уменьшения действующей концентрации ДТТ?

- Довольно трудно анализировать результаты гель-проникающей хроматографии сшитого глутаровым альдегидом и УФ альфа-кристаллина, поскольку не использованы маркеры молекулярной массы. По каким причинам различаются времена элюции в двух опытах (стр. 114 и 132)?
- Автором приведены данные ДСК для облученного УФ альфа-кристаллина и сделан вывод о сохранении определенного количества нативного белка в таком препарате. Означает ли это, что «сшитый» кристаллин может быть полностью нативным или просто в препарате есть доля немодифицированного белка?
- По опытам с глутаматдегидрогеназой есть только одно замечание. Автор обнаружил дестабилизирующее действие NADH на фермент. Известно, что в препаратах NADH обычно присутствует некоторое количество его производных, обладающих инактивирующим действием на NAD-зависимые дегидрогеназы. Исключить такое ингибирование можно только проведением хроматографической очистки с последующим хранением кофермента в бескислородной среде («под азотом»). Было бы неплохо проверить сохранение каталитической активности глутаматдегидрогеназы в присутствии данного кофактора, тем более, что, как правило, восстановленный и окисленный кофактор оказывают одинаковое стабилизирующее действие на NAD-зависимые дегидрогеназы.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Векшина Н.Л. (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- 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-RVPTI, 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).

- 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).

Отзыв Ведущей организации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» министерства образования и науки Российской Федерации (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- К сожалению, русскоязычная литература приведена в конце списка, а не в начале списка литературы.
- При общей положительной оценке этой интересной работы, необходимо отметить, что соискателю следовало бы уделить больше внимания исследованиям отечественных ученых кинетических и морфологических особенностей механизмов агрегации белков.
- Во введении диссертации и в автореферате, согласно ГОСТ Р. 7.0.11. – 2011 следовало бы добавить пункт – степень разработанности темы.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

заместителя директора по научной работе, заведующего лабораторией биофизической химии наносистем ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, доктора химических наук, профессора Зуева Ю.Ф., замечаний нет;

заведующей кафедрой медицинской биохимии и микробиологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», заслуженного деятеля науки РФ, доктора биологических наук, профессора Поповой Т.Н. и доцента кафедры медицинской биохимии и микробиологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», кандидата биологических наук Матасовой Л.В., замечаний нет;

главного научного сотрудника группы термодинамики белка ФГБУН Институт белка Российской академии наук, доктора физико-математических наук Потехина С.А. В отзыве приведено следующее замечание: «Не очень понятно назначение рисунка 1 в автореферате диссертации. Рисунок демонстрирует единственное и очевидное утверждение – прямо пропорциональная зависимость двух переменных графически может быть представлена прямой линией проходящей через ноль.»

ведущего научного сотрудника группы молекулярной биофизики ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, доктора биологических наук Рожкова С.П., замечаний нет;

ведущего научного сотрудника лаборатории химии протеолитических ферментов ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, доктора химических наук, профессора Ротановой Т.В. В отзыве приведено следующее замечание: «В качестве замечания по автореферату, которое ни в коей мере не влияет на высокую оценку работы, можно отметить, что поскольку основной раздел исследования (стр. 8-22) включает не только изложение экспериментальных данных, но и их обсуждение, это следовало отразить в его названии.»

заведующего лабораторией структурной динамики стабильности и фолдинга белков ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, доктора физико-математических наук, профессора Туроверова К.К. В отзыве приведено следующее замечание: «Единственный замеченный мною недочет – отсутствие рисунка под номером 8 (два рисунка имеют номер 7), что, конечно, не умаляет достоинства работы.»

заведующего НИЛ биохимии обмена веществ кафедры биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета, кандидата биологических наук, доцента Шолуха М.В., замечаний нет.

В дискуссии приняли участие: д.б.н., чл.-корр. РАН, проф. Гусев Н.Б., д.б.н., проф. Юрина Н.П., д.б.н. Муранов К.О. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук), д.б.н., проф. Шишкин С.С.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие основные результаты:

- Установлен механизм тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА). При тепловой денатурации БСА происходит образование форм белка, различающихся по способности к агрегации. Высокореакционноспособная форма характеризуется высокой скоростью агрегации и образует первичные агрегаты. Низкореакционноспособная форма вовлекается в процесс агрегации путем присоединения к первичным агрегатам с образованием вторичных агрегатов, а также способна к самоагрегации с образованием стабильных агрегатов небольшого размера. Дальнейшая агрегация протекает путем слипания вторичных агрегатов.
- Установлен кинетический режим тепловой и индуцированной дитиотреитолом (ДТТ) агрегации БСА. В случае тепловой агрегации (при 70 °С) порядок реакции по белку равен 2 и скорость-лимитирующей стадией является слипание развернутых молекул БСА. В случае ДТТ-индуцированной агрегации (при 45 °С) порядок реакции по белку равен 1 и скорость-лимитирующей стадией является разворачивание молекул белка.
- Показано существование предельной длительности лаг-периода при увеличении концентрации белка для ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина, связанное с наличием стадий, предшествующих образованию стартовых агрегатов.
- Разработана и апробирована методология количественной оценки антиагрегационной активности белковых и химических шаперонов. В качестве меры антиагрегационной активности для белковых шаперонов предложена адсорбционная емкость шаперона по отношению к белку-мишени (AC_0), для химических шаперонов – концентрация полунасыщения $[L]_{0,5}$.

- Показано, что сшивание альфа-кристаллина глутаровым альдегидом приводит к снижению шапероноподобной активности в 12 раз, при этом 6-кратное снижение происходит в результате денатурации альфа-кристаллина в процессе сшивания. Сшивание приводит также к дополнительному снижению антиагрегационной активности альфа-кристаллина при его облучении ультрафиолетовым светом.
- Установлено, что среди изученных химических шаперонов (пролина, аргинина и его производных) наиболее высокой антиагрегационной активностью обладают производные аргинина – аргининамид и этиловый эфир аргинина.
- Предложена и апробирована методология оценки антиагрегационной активности белковых шаперонов и специфических лигандов при тепловой агрегации глутаматдегидрогеназы из печени быка в режиме нагревания с постоянной скоростью.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

На основании сопоставления кинетики тепловой и ДТТ-индуцированной агрегации модельного белка (БСА), изученной двумя методами – методом фракционирования в поле асимметричного потока и методом динамического светорассеяния – определены соотношения между начальной скоростью агрегации и кинетическим параметром, характеризующим скорость прироста интенсивности светорассеяния для начальных участков кинетических кривых агрегации, и определен кинетический режим процессов агрегации. Установлено, что скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации в случае тепловой агрегации БСА при относительно высоких температурах (70 °C и выше) является стадия агрегации развернутых молекул белка, а в случае ДТТ-индуцированной агрегации БСА – стадия разворачивания белковой молекулы. Показана важность установления кинетического режима агрегации модельного белка для интерпретации эффектов, характеризующих защитное действие шаперонов, и для выяснения механизмов их антиагрегационной активности.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

- Разработан метод количественной оценки антиагрегационной активности белковых шаперонов. В качестве меры антиагрегационной активности для белковых шаперонов предложена адсорбционная емкость шаперона по отношению к белку-мишени (AC_0). Это может представлять интерес для изучения влияния различных модификаций на функционирование малых белков теплового шока и в частности

альфа-кристаллина, модификации и мутации которого связаны с развитием катаракты, кардиомиопатий и других патологий.

- Разработан метод количественной оценки антиагрегационной активности химических шаперонов. В качестве меры антиагрегационной активности для химических шаперонов предложена концентрация полунасыщения $[L]_{0.5}$. Этот метод может быть применен для поиска агентов, которые проявляют высокую антиагрегационную активность и могут быть использованы в биотехнологии при получении рекомбинантных белков и в медицинской биохимии при создании белковых лекарственных препаратов.
- Предложен метод анализа влияния лигандов, специфически связывающихся с белками-мишенями, на агрегацию белков в режиме нагревания с постоянной скоростью. Данный метод может быть применен при разработке новых лекарственных препаратов и в других областях биотехнологии и медицины для поиска соединений, специфически связывающихся с белками.

Оценка достоверности результатов выявила, что:

- использованные методики исследования корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- полученные экспериментальные закономерности являются статистически достоверными;
- выводы, представленные в данной работе, логичны и полностью соответствуют результатам проведенного исследования.

Личный вклад соискателя состоит в:

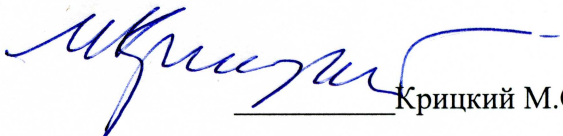
- получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов.
- обработке, интерпретации и анализе результатов исследований;
- оформлении и публикации полученных данных.

Диссертация Борзовой В.А. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого арсенала современных методов и взаимосвязанностью выводов и результатов.

На заседании 23 июня 2016 года диссертационный совет принял решение присудить Борзовой Вере Александровне учёную степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

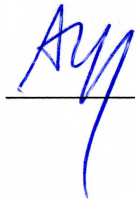
При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 чел., из них 12 докторов биологических наук, 5 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени 18, «против» нет, недействительных бюллетеней нет.

Заместитель председателя
диссертационного совета
ФИЦ Биотехнологии РАН
доктор биологических наук,
профессор



Крицкий М.С.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ФИЦ Биотехнологии РАН
кандидат биологических наук



Орловский А.Ф.

«23» июня 2016 г.