

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу КУПЕРМАН Марини Володимирівни
"Вивчення взаємодій між глобулярними білками і борвмісними каркасними
макроциклічними комплексами", представлену до захисту на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 –
молекулярна біологія

Пошук органічних сполук, здатних специфічно взаємодіяти з поверхнею глобулярних білків, і з'ясування молекулярних механізмів такої взаємодії є однією з важливих проблем молекулярної біології. Цей напрям досліджень є також суттєвим для медицини, оскільки він тісно пов'язаний з розробкою нових лікарських препаратів. Дисертаційна робота М. В. Куперман головним чином присвячена вивченню механізмів взаємодій з глобулярними білками низки сполук, що мають об'ємну каркасну будову і відносяться до двох класів – *клого-боратів* і *клатрохелатів заліза (II)*. Зважаючи на те, що сполуки цих класів вже широко застосовуються у медицині та біотехнологіях, тему дисертаційної роботи слід визнати **актуальною**.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, а також підтримана кількома міжнародними грантами.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 161 сторінку стандартного друкованого тексту (включаючи 6 додатків). Дисертація ілюстрована 38 рисунками і 9 таблицями, список використаних джерел містить 245 посилань. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 17 публікацій, в тому числі 7 статей у фахових наукових виданнях: усі статті надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus, серед них 6 – у журналах з імпаکت-фактором на рівні між 2 і 4. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо характеристики досліджених у роботі органічних сполук і модельних глобулярних білків, механізмів міжмолекулярних взаємодій та принципів деяких, використаних у роботі, фізичних методів дослідження таких взаємодій є стислим, але змістовним – таким, що демонструє належний рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів молекулярної біології та біофізики, описаних у Розділі 2: флуоресцентна спектроскопія, спектроскопія кругового дихроїзму, електронна мікроскопія, ізотермічна калориметрія титрування тощо.

Робота М. В. Куперман мала на меті ретельно дослідити взаємодії *клозо*-боратів і клатрохелатів з бичачим і людським сироватковими альбумінами (БСА і ЛСА) та низкою інших білків, вплив *клозо*-боратів на амілоїдну агрегацію інсуліну, а також розробити амілоїдчутливі флуоресцентні барвники. Отримані результати представлені у трьох розділах.

Розділ 3 присвячено аналізу взаємодії глобулярних білків – головним чином, БСА і ЛСА – з низкою *клозо*-боратів. За допомогою вивчення гасіння власної білкової флуоресценції показано сам факт взаємодії, оцінено спорідненість різних досліджених сполук до альбумінів і продемонстровано залежність цієї спорідненості від типу замісників. Методом ізотермічної калориметрії визначено термодинамічні параметри зв'язування досліджених сполук з альбумінами. Отримані результати є важливими для розуміння механізмів взаємодії *клозо*-боратів з глобулярними білками.

У розділі 4 представлено результати дослідження впливу одного із охарактеризованих у попередньому розділі *клозо*-боратів на вторинну структуру інсуліну, кінетику утворення цим білком амілоїдних фібрил та морфологію цих фібрил. За допомогою КД-спектроскопії автором показано, що за умов амілоїдної агрегації досліджений *клозо*-борат сприяє частковій денатурації інсуліну та втраті α -спіралей у його складі. Відповідно, аналіз

кінетики фібрилоутворення флуоресцентними методами засвідчив, що за певних концентрацій *клозо*-борат пришвидшує процес амілоїдної агрегації інсуліну. При цьому, за представленими у роботі даними електронної мікроскопії, *клозо*-борат сприяє формуванню нерозгалужених фібрил з більшим діаметром.

Крім того, розділ 4 містить результати дослідження низки бензотіазольних барвників двох типів – триметинових ціанінових та стирилціанінових – з різними замісниками. Серед сполук першої групи автором знайдено барвники, що мають високу чутливість до амілоїдних фібрил інсуліну та лізоциму – до 70 разів підвищують інтенсивність своєї флуоресценції у присутності таких фібрил. Натомість, сполуки другої групи не проявляють чутливості до амілоїдних агрегатів та білків взагалі, але суттєво підвищують свою флуоресценцію у присутності дволанцюгових нуклеїнових кислот.

Розділ 5 присвячено дослідженням, спрямованим на з'ясування механізмів взаємодії низки клатрохелатів заліза (II) із сироватковими альбумінами та β -лактоглобуліном. Автором продемонстрована залежність гасіння флуоресценції білків клатрохелатами від типу замісника у складі цих сполук та за допомогою ізотермічної калориметрії визначені термодинамічні параметри зв'язування. Особливий інтерес викликає отриманий автором результат щодо індукції білками КД-спектрів у оптично неактивних клатрохелатів. Знову, такий індукований КД-відгук залежить від типу замісників. При цьому, і це ще цікавіше, він також залежить від типу білка: отримані результати свідчать, що деякі клатрохелати можна використовувати як своєрідні КД-репортери, що здатні відрізнити БСА від ЛСА, а також є чутливими до конформаційних змін білків.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи М. В. Куперман полягає в тому, що в ній вперше досліджено взаємодію *клозо*-боратів і клатрохелатів заліза з

низкою глобулярних білків та їхніх агрегатів, з'ясовано деякі механізми такої взаємодії та знайдено сполуки з високою спорідненістю до досліджених білків. Представлені у роботі дані збагачують знання щодо принципів міжмолекулярних взаємодій за участі білків. Досліджені у роботі сполуки можуть бути використані як ефективні ліганди, що взаємодіють з поверхнею білків, чутливі до особливостей конформації білків КД-репортери, флуоресцентні зонди фібрилоутворення тощо. Отримані результати можуть бути корисними для розробки лікарських препаратів, які діють за рахунок зв'язування з білками. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузях молекулярної біології і медицини, а також у практичних розробках, що проводяться в академічних, освітніх та медичних установах, які працюють над вивченням взаємодії білків з іншими молекулами і пошуком нових підходів у лікуванні захворювань.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють констатувати загальну **достовірність експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків.**

Загалом, дисертація демонструє високий рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх. Разом з тим, до дисертаційної роботи М. В. Куперман виникли наступні зауваження та запитання.

1. У розділі Матеріали і методи представлено рівняння (рівн. 2.1), яке було використане для корекції даних флуоресцентних вимірювань на ефект внутрішнього фільтра. Рівняння є у принципі вірним, але не зовсім точним: зазвичай в ньому перед оптичною густиною ставиться коефіцієнт, величина якого залежить від геометрії конкретного приладу і оцінюється емпірично (про це йдеться, зокрема, у цитованих автором роботах 212, 213). Чи проводилась така оцінка? Чи було з'ясовано у модельних вимірюваннях, що рівн. 2.1 в точності (для використаного у роботі приладу) враховує ефект

внутрішнього фільтра? Такі модельні вимірювання могли б полягати, наприклад, у реєстрації флуоресценції білків чи вільного триптофану у присутності сполук, що поглинають в області збудження і флуоресценції, але напевно не взаємодіють з триптофаном і не здатні виступати динамічними гасниками його флуоресценції.

2. Наведені автором міркування на користь того, що гасіння флуоресценції залишків триптофану в альбумінах дослідженими сполуками є статичним (підрозділ 3.1.1), має сенс. Але, по-перше, на жаль не представлено модельних досліджень можливого динамічного гасіння вільного триптофану цими сполуками. По-друге, не досліджувався вплив температури на гасіння флуоресценції – цей вплив є протилежним для динамічного і статичного механізмів гасіння, і такі експерименти могли б зняти це питання. Приймаючи до уваги інші результати, представлені у роботі (зокрема, по ізотермічній калориметрії), наявність статичного компоненту у гасінні флуоресценції не викликає сумнівів. Проте, динамічний компонент також не є виключеним – принаймні для деяких із досліджених сполук. Справа в тому, що лінійні графіки Штерна-Фольмера (формат, використаний у роботі з незначними модифікаціями) можуть спостерігатись при обох механізмах гасіння. При наявності флуорофорів з різною доступністю графік вигинається уверх (часто спостерігається на наведених у роботі графіках, особливо для ЛСА, який містить два залишки Trp, що суттєво розрізняються своїм оточенням). Але при наявності обох компонент – статичної і динамічної – графік може прогинатись униз: саме це спостерігається для початкових частин графіків Штерна-Фольмера на рис. 5.4, 5.6, 5.7 (для клатрохелатів заліза). Крім того, статичне і динамічне гасіння флуоресценції суттєво розрізняються за ефектом гасника на час життя збудженого стану: для динамічного гасіння час життя змінюється так само, як і інтенсивність флуоресценції, для статичного – часто не змінюється зовсім. Порівняння даних рис. 3.2 і табл. 3.1 вказує, що в даному випадку маємо проміжний випадок – час життя зменшується у присутності гасників, але не так суттєво, як інтенсивність.

3. У табл. 3.2 наведено оцінки констант зв'язування *клозо*-боратів з альбумінами на основі даних по гасінню флуоресценції, представлених на рис. 3.3. Чому аналогічні оцінки не зроблені для інших *клозо*-боратів (рис. 3.2)?

4. Кілька запитань викликає підрозділ 3.3, що стосується вивчення термодинаміки зв'язування *клозо*-боратів з альбумінами методом ізотермічної калориметрії. На жаль, не наведено рівняння, яке використовувалось для аналізу (і оцінки термодинамічних параметрів), а також результати (у графічному вигляді) підгонки цього рівняння під експериментальні дані. Це ускладнює сприйняття обговорення щодо типів і кількості сайтів зв'язування. Крім того, чому для гідроген-*клозо*-боратів аналізується їхнє зв'язування з БСА (і робиться висновок про один тип сайтів зв'язування), а для галоген-*клозо*-боратів – з ЛСА, для якого постулюються сайти двох типів? Було б логічніше або порівнювати два білки щодо їхнього зв'язування з одним і тим самим набором сполук, або два набори сполук щодо їхнього зв'язування з одним і тим самим білком.

5. Кілька зауважень викликає і обговорення отриманих термодинамічних параметрів зв'язування лігандів. Автор інтерпретує негативне значення ентальпійного внеску у вільну енергію зв'язування як ознаку "сил міжмолекулярного притягання", а позитивне значення ентропійного внеску – як ознаку гідрофобних взаємодій. Це має сенс, якщо під "силами міжмолекулярного притягання" розуміти вандерваальсові взаємодії і/або водневі зв'язки. Але неможливо погодитись із твердженням автора про те, що "вірогідно, сили міжмолекулярного притягання переважно включають електростатичні взаємодії через заряд борного кластера": електростатичні (іонні) взаємодії характеризуються практично нульовим ентальпійним внеском, маючи ентропійну природу. Щодо гідрофобних взаємодій, то вони дійсно зазвичай супроводжуються зростанням ентропії. Але для прямої демонстрації гідрофобних взаємодій потрібно було б показати наявність негативної зміни теплоємності при комплексоутворенні –

позитивне значення зміни ентропії може бути зумовлене також іншими причинами (ефектами дегідратації, іонними взаємодіями тощо).

6. На жаль, у тексті практично не обговорюється рис. 5.5, який, на думку автора, демонструє короткохвильовий зсув спектру флуоресценції бичачого альбуміну у присутності одного з клатрохелатів. На мою думку, цей рисунок показує, скоріше, не зсув спектру, а зростання тирозинової флуоресценції, яка, як добре відомо, практично не проявляється для вільного альбуміну за рахунок фьорстерівського перенесення енергії на триптофан та інших механізмів гасіння. Цей цікавий ефект був би вартий більш детального аналізу. Крім того, такий "зсув" очевидно дає внесок у гасіння флуоресценції (що вимірюється, напевно, при довжині хвилі максимуму спектру флуоресценції вільного альбуміну).

7. На поверхні альбуміну добре охарактеризовані два сайти зв'язування для різноманітних лігандів. Представлені у роботі дані щодо конкурентного зв'язування клатрохелатів і двох лігандів, які з високою спорідненістю взаємодіють з цими сайтами, чітко вказують, що зазначені сайти не використовуються клатрохелатами. Відтак, із цими результатами не узгоджується представлена у підрозділі 5.7 модель, згідно якої клатрохелат зв'язується у сайті 1.

8. У тексті роботи зустрічаються друкарські, орфографічні і пунктуаційні помилки та невдалі вирази.

Наведені зауваження жодним чином не впливають на загальну позитивну оцінку розглянутої роботи.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Куперман Марини Володимирівни "Вивчення взаємодій між глобулярними білками і борвмісними каркасними макроциклическими комплексами" є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів

дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри загальної та медичної генетики
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського
національного університету імені Тараса Шевченка

А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую



Комп'ютерно підписано Т.А.

Заст. директора ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка