

ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации Веселова Максима Михайловича «Разработка
магниточувствительных систем на основе агрегатов
магнитных наночастиц с ферментами» на соискание ученой
степени кандидата химических наук по специальностям
1.5.6. Биотехнология и 1.4.14. Кинетика и катализ

Создание материалов, меняющих свои свойства под действием внешних полей, является важнейшей задачей современной науки о материалах. В частности, исследование магнитных наночастиц привело к появлению целого области нанотехнологии, изучающей влияние переменных магнитных полей на ферменты, иммобилизованные на магнитных наночастицах. В основе рецензируемой работы лежит способность магнитных частиц претерпевать вращение при помещении в переменное низкочастотное магнитное поле. В случае использования переменного магнитного поля высокой частоты это приводит к разогреву системы за счет сил трения. Однако в маловязких системах и в случае применения низкочастотного переменного магнитного поля существенного разогрева может и не происходить.

Свойство магнитных наночастиц вращаться в переменном магнитном поле было использовано в работе Веселова М.М. При этом в основу работы была положена идея о том, что молекула фермента, ковалентно присоединенная к двум магнитным наночастицам может испытывать механическое напряжение в переменном магнитном поле. Это могло бы приводить к конформационным изменениям, проявляющимся в изменении активности фермента. Ранее конформационные изменения в структуре ферментов, ковалентно связанных с магнитными частицами, помещенными в переменное магнитное поле, систематически не исследовался, что определяет новизну данной работы.

Работа Веселова М.М. построена традиционным образом. Обзор литературы написан очень широко и затрагивает самые разные способы

воздействия на активность фермента: световое и микроволновое излучение, изменение набухания микрогеля за счет изменения ионной силы или pH, локальный разогрев за счет использования плазмонных наночастиц. Большое внимание уделено классическим работам Ильи Васильевича Березина, касающихся изменению активности сорбированных на полимерных подложках ферментов за счет механической деформации подложки. Подробно излагаются известные работы Анатолия Леонидовича Бучаченко по модуляции активности АТФ-зависимый ферментов за счет магнитной активации изотопа ^{25}Mg в активном центре АТФ-синтазы. Обзор написан очень интересно и заслуживает отдельной публикации.

Методическая часть диссертации написана также очень подробно. Все методы описаны таким образом, чтобы их можно было воспроизвести в любой лаборатории.

Основные результаты работы касаются трех различных надмолекулярных систем. Во-первых, автор получает системы типа «магнитная наночастица-химотрипсин-магнитная наночастица». В данной системе ранее была продемонстрирована возможность регуляции активности фермента за счет приложения переменного магнитного поля низкой частоты в работах Ефремовой М.В., однако причины данного эффекта исследованы не были. В рецензируемой работе с помощью ИК-спектроскопии было убедительно показано, что в результате приложения внешнего магнитного поля происходят изменения вторичной структуры фермента: уменьшается количество α -спиральных участков и увеличивается доля неупорядоченных фрагментов в макромолекуле фермента.

Анализ кинетики ферментативной реакции с участием фермента, претерпевшего воздействие магнитного поля, показано увеличение константы Михаэлиса при сохранении каталитической константы, что свидетельствует о том, что в индуцированных деформацией конформационных изменениях макромолекулы фермента участвует субстрат-связывающий центр фермента, но они не затрагивают

каталитический центр. Кроме того, обращает на себя внимание, что при воздействии магнитного поля происходит кардинального разрушения молекулы фермента, а изменения носят локальный характер. Хотел бы также отметить, что для измерения ферментативной активности автор использует не широко применяемые малоспецифические низкомолекулярные субстраты на основе тирозина (БТНА или БТЭЭ), а высокоспецифичный тетрапептидный субстрат NSAAPpNA с относительно низкой Константой Михаэлиса 43 мМ. Это повышает надежность измерений, выполненных в работе. Очень приятное впечатление произвели также выполненные автором модельные расчеты с помощью метода молекулярной динамики, полностью подтвердившие выводы об изменении структуры субстрат-связывающего центра фермента под действием внешнего механического поля.

Вторая система, исследованная в работе, похожа на описанную выше, но вместо α -химотрипсина был взят фермент с четвертичной структурой – алкогольдегидрогеназа. В этой части работы автор провел тщательное варьирование количества связей, которыми фермент прикреплялся к наночастицам. В результате удалось показать, что наиболее яркий ответ на воздействие магнитного поля проявляли агрегаты, в которых количество связей было минимальным. На мой взгляд, этот раздел исключительно важен для данной работы, поскольку продемонстрировал общность использованного подхода для ферментов различной структуры.

Исключительно интересна и важна также третья часть работы, в которой автор исследовал влияние магнитного поля на комплексы фермент-ингибитор. Сложность этой системы состояла в том, что как фермент (α -химотрипсин), так и белковый ингибитор по размеру значительно меньше используемых наночастиц. Поэтому образование комплексов фермент-ингибитор в такой системе сопряжено со значительными стерическими затруднениями. При этом в качестве наночастиц для этой задачи были использованы гантелеобразные частицы, в которых магнетитовая часть отделена от золотой части, к которой привязан фермент. Для повышения

коллоидной стабильности этих систем автор покрыл магнетитовую часть наночастиц полиэтиленгликолем, содержащим на конце нитродофамин, кислые гидроксилы которого имели сродство к магнетиту.

Оказалось, что по умолчанию в такой системе реализуются все возможные комбинации агрегатов, однако при тщательном подборе условий модификации фермента автору удалось получить такие частицы, в которых большая часть белка находилась между двумя - тремя наночастицами. При этом оказалось, что приложение внешнего магнитного поля приводит к частичной диссоциации комплекса с повышением активности фермента. Замена низкоаффинного ингибитора трипсина на ингибитор Баумана-Бирк, характеризующегося константой ингибирования порядка нМ сделало систему уже полностью нечувствительной к действию магнитного поля.

В целом работа производит очень благоприятное впечатление. Ее основное достоинство – чрезвычайно аккуратная интерпретация фактов и скрупулезный подбор условий в чрезвычайно сложных системах. Но, как это часто бывает, достоинства работы неразрывно связаны с некоторыми недостатками.

1) На мой взгляд, многих сложностей можно было бы избежать, если бы сайты белка прикрепляемые к поверхности наночастиц, располагались бы в молекуле белка не статистическим образом, а вводились бы методами сайт-направленного мутагенеза. В этом случае можно было бы строго контролировать количество и локализацию связей между молекулой фермента и поверхностью наночастиц. В меньшей степени, но также более однозначно эту задачу можно было бы решить присоединением дисульфидов к магнитным наночастицам, используя "ортогональные" модификаторы. В этих случаях можно было бы контролировать выход именно димерных агрегатов и избежать образования более крупных частиц. Например, один тип частиц можно было бы модифицировать солями фенилдиазония, способными реагировать с остатками тирозина (4 остатка на молекулу α -химотрипсина), а другой тип - был бы направлен на остатки аспартата и

глутамата. Однако очевидным преимуществом использованного в работе подхода является его универсальность, что было блестяще продемонстрировано на примере алкогольдегидрогеназы.

2) При прочтении работы сразу же возникает вопрос о том, каким образом автору удастся избежать образования очень крупных частиц за счет связывания одной наночастицей двух молекул фермента. При значительном различии размеров наночастиц и белковых макромолекул образование таких трехмерных олигомеров более чем ожидаемо. Автор не упоминает, каким образом удастся этого избежать или очистить препарат от таких "олигомерных" агрегатов.

3) В работе отсутствует объяснение того, почему в экспериментах с ингибитором трипсина поверхность магнетита пришлось покрывать полиэтиленгликолем. Очевидно, что это должно увеличивать коллоидную стабильность наночастиц и их агрегатов, однако непонятно, почему необходимость этого возникла только при получении комплексов фермент-ингибитор, а в предыдущих частях работы при получении комплексов типа "наночастица-химотрипсин-наночастица" поверхность наночастиц ПЭГом не покрывали.

4) Возникает вопрос, может ли влиять адсорбированный на поверхности фермент и, тем более, ПЭГ на вращение частиц в переменном магнитном поле? Влияет ли на форма магнитной частицы на скорость вращения и, как следствие, на силу, с которой магнитное поле воздействует на структуру белка? Как в этом контексте различаются деформирующая способность сферических ("ядро-оболочка") и гантелевидных частиц "магнетит@Au"?

5) В работе следовало бы упомянуть об источнике ингибитора трипсина, поскольку известно множество различных белковых ингибиторов трипсина, сильно различающихся по своему сродству к α -химотрипсину.

Отмеченные недостатки носят скорее характер рекомендаций не умаляют значимость диссертационного исследования Веселова Максима

Михайловича. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология и 1.4.14. Кинетика и катализ, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, Веселов Максим Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.6. Биотехнология и 1.4.14. Кинетика и катализ.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич



02.05.2024.

Контактные данные:

тел.: 7(495)9393127, e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, дом 1, стр. 3

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет

*Тел.: +7(495)9393127; e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru

Подпись сотрудника химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, Н.С. Мелик-Нубарова удостоверяю:

02.05.24.

