

Федеральное государственное учреждение  
**«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»**

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; www.fbras.ru; e-mail: info@fbras.ru

2/xi-15 № 12307-6224

На № \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ:



Директор  
Федерального государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»  
чл.-корр. РАН  
Попов В.О.  
\_\_\_\_\_ 2015 г.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на  
диссертационную работу Агутиной Е.Ю.  
«Образование белковых агрегатов, индуцируемое пептидами»

Диссертационная работа «Образование белковых агрегатов, индуцируемое пептидами» выполнена на базе лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». В период подготовки диссертационной работы соискатель Агутина Екатерина Юрьевна исполняла обязанности младшего научного сотрудника.

В июне 2011 г. Агутина Е.Ю. окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Сибирский Федеральный Университет по специальности «Биохимия», а в октябре 2011 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, где проходила обучение по июль 2015 г. С июля 2015 г. продолжила обучение в очной аспирантуре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в апреле 2015 г. в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук.

Тема диссертационной работы утверждена на заседании Учёного совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (Протокол № 10 от 18 декабря 2014 г.).

**Научный руководитель:**

Гурвиц Берта Яковлевна, доктор биологических наук, профессор, 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».

Подготовленная диссертационная работа Агутиной Е.Ю. была представлена 29 октября 2015 года на совместном семинаре лабораторий биоэнергетики и структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

**Актуальность темы и направленность исследования.**

Одним из фундаментальных направлений современной биологии и биотехнологии является исследование ассоциации и агрегации белков. В процессе фолдинга белки приобретают уникальную трехмерную структуру, определяющую их биологическую активность. В результате мутаций, посттрансляционных модификаций, окислительных повреждений, изменений условий окружающей среды (рН, УФ-облучения, температуры) происходит нарушение конформации молекулы белка, приводящее к его агрегации. В результате формируются различные структуры: растворимые олигомеры, аморфные агрегаты и амилоидоподобные фибриллы, вызывающие так называемые «конформационные болезни».

Однако в последние несколько десятилетий были выявлены многочисленные непатогенные белки и пептиды, которые при определенных условиях образуют ассоциаты (от аморфных агрегатов до высокоструктурированных фибрилл), сходные по морфологическим свойствам с теми, которые выявляются при «конформационных болезнях». В настоящее время общепринятым считается представление о том, что формирование белками и пептидами фибриллоподобных структур является универсальным свойством полипептидных цепей. Кроме того, взгляды на агрегацию белков как на патологический процесс, являющийся первопричиной «конформационных болезней», в значительной степени подвергаются сомнениям. Далеко не всегда можно утверждать, что именно формирование амилоидоподобных агрегатов индуцирует развитие того, или иного заболевания. Накоплено большое число фактов, свидетельствующих о том, что белковые агрегаты могут быть функционально активными и выполнять определенную биологическую роль в живой системе. Такие структуры получили название «функциональные амилоиды».

В этой связи весьма актуальным представляется поиск агентов, индуцирующих формирование определенных белковых агрегатов с заданными свойствами. В отличие от торможения агрегатообразования под действием молекулярных шаперонов, защитная функция которых по отношению к белкам, утратившим нативную конформацию, достаточно хорошо изучена, в настоящее время данные о функционировании низкомолекулярных биогенных соединений, которые способны предотвращать агрегацию белков, а также участвовать в трансформации агрегатов, весьма ограничены. На роль таких соединений могут претендовать аминокислоты и пептиды в качестве инструмента для исследования способности биогенных агентов, естественно присущих биологическим системам, влиять на конформацию склонных к агрегации белков. При определенных условиях подобные эффекторы могут выступать в роли регуляторов процесса агрегатообразования.

Большое внимание уделяется шапероноподобному агенту аргинину, широко используемому в биотехнологии и медицине. Однако в большинстве случаев аргинин применяется в больших концентрациях, что не всегда приемлемо. Аргинин преимущественно взаимодействует с отрицательно заряженными и ароматическими аминокислотными остатками белков. При разработке новых эффективных добавок, влияющих на агрегацию белков при более низких концентрациях, представляется целесообразным исследование действия аргинина, включенного в состав коротких пептидов, проявляющих способность вступать как в электростатические, так и гидрофобные взаимодействия с развернутыми белками. Аргинин в составе амфифильных пептидов может быть более эффективным защитным агентом, предотвращающим белковую агрегацию, по сравнению со свободным аргинином. При этом решающую роль играет суммарный заряд белка, компетентного к агрегации, который подвержен изменениям под воздействием pH среды. Влияние изменения pH среды на биологические процессы является одним из основных принципов регуляции в живых системах, поэтому исследования молекулярных механизмов агрегации белков с учетом изменения pH весьма актуальны.

#### **Конкретное личное участие автора в получении научных результатов.**

Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены либо автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов. Обсуждение, обобщение и интерпретация некоторых экспериментальных данных, формулировка основных положений диссертации, составляющих ее новизну и практическую значимость, формирование цели, задач, выводов и обсуждение результатов проводилось совместно с научным руководителем.

#### **Степень достоверности результатов проведённых соискателем учёной степени исследований.**

Выводы, представленные в этой работе, полностью подтверждены экспериментальными данными. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Использованные методики исследования и проведённые расчеты корректны.

### **Новизна и ценность результатов, полученных лично автором в ходе научного исследования.**

Впервые показано, что действие пептидов Arg-Phe и АСТН (1-24) на агрегацию модельных белков проявляется при концентрациях, в 100–1000 раз меньших по сравнению с эффектами Arg, известного шапероноподобного агента. Эти результаты свидетельствуют о возможности преимущественного использования Arg-содержащих дипептидов, включающих гидрофобные аминокислотные остатки, в биотехнологии и медицине вместо Arg. Кроме того, в отличие от индивидуальной аминокислоты Lys, ускоряющей агрегацию модельного белка, включение Lys в состав дипептида Lys-Leu вызывает противоположный эффект – торможение процесса агрегации.

На примерах рекомбинантного инсулина человека и  $\alpha$ -лактальбумина коровьего молока продемонстрирована возможность изменять действия на агрегацию белков Arg и пептидов Arg-Phe, Lys-Leu и АСТН (1-24) на противоположно направленные (торможение или ускорение агрегации) путем изменения рН среды в узком диапазоне физиологических значений от рН 7.0 до рН 8.0. На модельных белках впервые показаны также разнонаправленные эффекты Arg, зависящие от его концентрации – ускорение агрегации белков при низких (10–100 мМ) и торможение при высоких (более 300 мМ) концентрациях.

С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) выявлены морфологические особенности структур агрегатов инсулина и  $\alpha$ -лактальбумина, образующихся на начальных этапах процесса агрегации под действием Arg, Lys, Arg-Phe или АСТН (1-24). Показано, что в присутствии пептидов формируются гетерогенные гранулярные частицы, соединяющиеся в длинные цепи или фибриллоподобные волокна, в отличие от аморфных частиц, наблюдаемых в отсутствие эффекторов.

### **Практическая значимость диссертации и использование полученных результатов.**

Исследования механизмов взаимодействия аминокислот и пептидов с модельными белковыми субстратами, склонными к агрегации, могут способствовать расширению представлений о фундаментальных аспектах конформационной лабильности белков и процессах самоассоциации и агрегации белков *in vivo*.

Результаты данной работы могут быть использованы при разработке новых эффективных добавок в биотехнологии при получении рекомбинантных белков, а также при создании белковых препаратов медицинского назначения. При рассмотрении защитного действия пептидов на агрегацию модельных белков выявлена возможность преимущественного использования Arg- и Lys-содержащих амфифильных дипептидов вместо Arg, поскольку для снижения начальной скорости процесса агрегации в два раза требуются концентрации пептидов, в 100–1000 раз меньшие, по сравнению с Arg. Кроме того, в работе показано, что эффекты Arg и исследуемых пептидов изменяются на противоположные при изменении рН среды в узком диапазоне физиологических

значений от pH 7.0 до pH 8.0, что свидетельствует о возможности тонкой регуляции процесса агрегации белков.

**Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите.**

Представленная Агутиной Екатериной Юрьевной диссертационная работа посвящена изучению действия аргинина и аргинин-содержащих пептидов на агрегацию модельных белков и сравнению морфологических свойств агрегатов, образованных под действием исследуемых эффекторов. Работа соответствует специальности 03.01.04 Биохимия, по которой рекомендуется к защите.

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем учёной степени.**

По теме диссертации опубликовано 5 статей, отражающих основной объём диссертационной работы, в изданиях, удовлетворяющих требованиям п. 13 «Положения присуждении учёных степеней» утверждённого Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842, и перечню рецензируемых журналов ВАК РФ:

**Список публикаций:**

1. Artemova N., Stein-Margolina V., **Smirnova E.**, Gurvits B. (2012) Formation of supramolecular structures of a native-like protein in the presence of amphiphilic peptides: Variations in aggregate morphology. *FEBS Letters*. V. 586. No 2. P. 186-190.
2. **Smirnova E.**, Safenkova I., Stein-Margolina V., Shubin V., Gurvits B. (2013) L-Arginine induces protein aggregation and transformation of supramolecular structures of the aggregates. *Amino Acids*. V. 45. No 4. P. 845-855.
3. **Smirnova E.**, Chebotareva N., Gurvits B. (2013) Transient transformation of oligomeric structure of alpha-crystallin during its chaperone action. *International Journal of Biological Macromolecules*. V. 55. P. 62-68.
4. **Smirnova E.**, Safenkova I., Stein-Margolina V., Shubin V., Gurvits B. (2014) Can aggregation of insulin govern its fate in the intestine? Implications for oral delivery of the drug. *International Journal of Pharmaceutics*. V. 471. P. 65-68.
5. **Smirnova E.**, Safenkova I., Stein-Margolina V., Shubin V., Polshakov V., Gurvits B. (2015) pH-responsive modulation of insulin aggregation and structural transformation of the aggregates. *Biochimie*. V. 109. P. 49-59.

Результаты работы также были опубликованы в материалах 9 конференций и представлены на 1 международной и 1 всероссийской конференциях.

Считать диссертационную работу Агутиной Екатерины Юрьевны «Образование белковых агрегатов, индуцируемое пептидами» законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует критериям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» утверждённом Правительством РФ от 24.09.2013г. № 842, и профилю диссертационного совета Д

002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Работа отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и может быть представлена к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.


Рекомендовать диссертационному совету Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» принять к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия диссертационную работу Агутиной Екатерины Юрьевны «Образование белковых агрегатов, индуцируемое пептидами» (научный руководитель д.б.н., проф. Гурвиц Б.Я.).

Заключение принято на совместном семинаре лабораторий биоэнергетики и структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» путём открытого голосования. Присутствовало на семинаре – 21 человек. Результаты голосования: «за» – 21 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет. Протокол №1 от «29» октября 2015 г.

Председатель  
совместного семинара лабораторий  
заведующий лабораторией биоэнергетики  
д.б.н., проф.

 /Юрина Н.П./

Секретарь  
совместного семинара лабораторий  
научный сотрудник лаборатории  
биоэнергетики  
к.б.н.

 /Терехова И.В./