

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 25 февраля 2016 г. № 4 о присуждении
Агутиной Екатерине Юрьевне, гражданство Российская Федерация, учёной
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Образование белковых агрегатов, индуцируемое пептидами» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 22 декабря 2015 года (протокол № 4) 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 Агутина Екатерина Юрьевна, 1989 года рождения, в июле 2011 г. окончила с отличием Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Сибирский Федеральный Университет по специальности «Биохимия». 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 по ноябрь 2015 г. продолжила обучение в очной аспирантуре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Диссертационную работу Агутина Е. Ю. выполняла в лаборатории структурной биохимии белка Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель – Гурвиц Берта Яковлевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», ведущий научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка.

Официальные оппоненты:

Муронец Владимир Израилевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 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» в своём положительном заключении, утвержденном

проректором по научной работе, доктором философских наук, профессором Кирабаевым Нуром Сериковичем, указала, что диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой и отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013г., а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что доктор биологических наук, профессор Муронец Владимир Израилевич является специалистом в области фолдинга и агрегации белков, в сферу его интересов входит также исследование торможения белковой агрегации под действием полиэлектролитов на основе электростатических и гидрофобных взаимодействий. Доктор биологических наук Векшин Николай Лазаревич является специалистом в исследовании конформации белков с использованием преимущественно оптических методов. Выбор ведущей организации обусловлен тем, что в этом Университете ведутся исследования в области метаболизма аминокислот, в том числе и аргинина, а также редокс-зависимых процессов в клетке.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 14 публикациях, в том числе в 5 статьях в рецензируемых зарубежных научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

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.

и 9 тезисах в материалах российских и международных конференций.

В публикациях отражены экспериментальные работы, проведенные в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора Муронца В.И. (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания:

- Обзор литературы написан хорошо и позволяет оценить вклад диссертанта в исследуемую проблему. Однако, на мой взгляд, следовало бы сконцентрироваться на нескольких особенно важных аспектах и изложить их более подробно и основательно. Автор попытался написать «обо всем» в ущерб глубине изложения. Не совсем понятно, по каким критериям были отобраны те или иные обсуждаемые работы, поскольку, безусловно, обсудить все работы по излагаемым темам невозможно. При этом не хватило места на описание объектов исследования («модельных белков», по терминологии автора). Эта информация перенесена в раздел «Результаты».

- В отечественной медицинской литературе принято название «Болезнь Гентингтона». При этом белок, связанный с этим заболеванием, во всех случаях называют «хантингтин». Конечно, биологи и другие специалисты часто пользуются термином «Болезнь Хантингтона», но уж лучше не исправлять исторически сложившуюся терминологию.

- Список литературы довольно обширный, но далеко не полный. В последнее время появилась тенденция давать ссылки на последние работы, забывая о тех ученых, которые сделали первыми то или иное наблюдение. К сожалению, во многих редакциях журналов авторам предлагают идти по тому же пути. Правильно было бы дать ссылку на первую работу по данной теме, а потом одну или несколько на самые последние публикации. В этом случае будет хотя бы понятно, по каким критериям автор отбирал публикации. Например, при описании химических шаперонов следовало бы упомянуть одну из первых работ в этой области (Rariy R.V., Klibanov A.M. Correct protein folding in glycerol. Proc Natl Acad Sci USA. 1997, 94(25):13520-3) (стр. 23). Естественно, что не Хартл в 2011 году первым обнаружил АТР-зависимые шапероны (стр. 18).

- Что понимает автор под «мисфолдингом прионных белков» (стр. 23)? Последний абзац на стр. 31 – три не связанных логично предложения.

- Непонятно, по каким причинам в списке литературы идут сначала ссылки на международные журналы, а потом на отечественные.

- Название диссертации не совсем точно отражает ее содержание – ведь пептиды не только индуцируют, но и предотвращают агрегацию белков. Более разумно было бы дать обобщающее название.

- Нигде не описано определение активности алкогольдегидрогеназы, а без такой информации трудно судить о нативности и чистоте препарата. Для опытов с АНС указаны очень близкие длины волн возбуждения и эмиссии флуоресценции (395 и 450 нм) (стр. 51). Не ошибка ли это? Обычно 350 и 420 нм или даже большая разница в этих параметрах.

- ...полученные результаты могут быть использованы для научно обоснованного создания белковых препаратов медицинского назначения, прежде всего, инсулина. Мне кажется, что в этом разделе можно было бы обсудить возможную роль микроорганизмов желудочно-кишечного тракта в регуляции проникновения белковых препаратов через стенку кишечника.

Этот аспект привлекает все большее внимание исследователей и роль пептидов в регуляции такого рода процессов может быть достаточно важной.

- Несколько особняком стоит раздел, касающийся трансформации структуры альфа-кристаллина в процессе его шапероноподобного действия.

Автор даже не внес этот раздел в автореферат.

- На стр. 57 дано описание опытов по гель-проникающей хроматографии, которую автор проводил «совместно» еще с двумя научными сотрудниками – доктором и кандидатом наук. Надо было написать как-то иначе.

- На стр.88 рис.3.23 следовало бы дать фотографию электронной микроскопии агрегатов инсулина без добавления аргинина.

- Непонятно как проводили опыты по определению молекулярной массы в неденатурирующих условиях (стр. 108). Какой тип электрофореза был использован – градиентный, «голубой»?

- Следовало бы более подробно описать механизм дитиотреитол-индуцируемой агрегации белков и хотя бы обсудить возможную роль исследованных эффекторов в регуляции разрыва и образования дисульфидных связей при агрегации белков и, особенно, их фибриллизации.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Векшина Н. Л. (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания:

- В литературном обзоре содержатся лишь фрагментарные сведения о молекулярных шаперонах, следовало бы привести более полную информацию о полифункциональности белков теплового шока, дать анализ литературных данных, не ограничиваясь простым изложением опубликованных материалов;

- Недостаточно внимания уделено обсуждению результатов. В частности, автору следовало бы дать более полный сравнительный анализ молекулярных механизмов взаимодействия аргинина и исследованных пептидов с модельными белками. Подобный анализ необходим для

расширения современных представлений о защитных функциях аргинина по отношению к белкам, утратившим нативную конформацию, поскольку, несмотря на то, что шапероноподобные свойства аргинина интенсивно изучаются в течение двух последних десятилетий, механизмы его действия на белки недостаточно ясны. Стоило бы привести гипотетическую схему для иллюстрации белок-пептидных взаимодействий, что облегчило бы их понимание;

- Целесообразно было также исследовать изменения активности некоторых из модельных белковых субстратов под действием эффекторов при различных условиях;

- В заключении следовало бы более полно и четко обобщить полученные результаты, а не ограничиваться их простым перечислением;

- Следовало бы включить результаты, полученные ^1H ЯМР в автореферат.

Отзыв Ведущей организации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российского университета дружбы народов» (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- При общей положительной оценке этой интересной работы необходимо отметить, что соискателю следовало бы уделить больше внимания общему заключению, в котором детально изложить итоговые результаты исследования;

- Имеющиеся к автору замечания, касаются отсутствия в диссертационной работе данных о кинетических и морфологических особенностях агрегатов, образующихся при инкубации белков с пептидами в течение более длительного времени по сравнению с выбранными экспериментальными условиями;

- Было бы интересно также посмотреть агрегацию в присутствии хотя бы двух модельных белков одновременно;

- Кроме того, в обзоре литературы стоило бы привести больше информации о молекулярном шапероне – альфа-кристаллине, т. к. детально исследуется взаимодействие альфа-кристаллина с альфа-лактальбумином;

- К достоинствам диссертации отнесено рассмотрение автором как основополагающих, так и современных работ, включающих 283 ссылки, однако отечественные работы почему-то приводятся в конце, а не в начале списка.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Зам. директора по научной работе, заведующего лабораторией биохимии процессов онтогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, доктора биологических наук Натальи Петровны Шаровой, замечаний нет;

заведующего кафедрой медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Воронежского государственного университета, доктора биологических наук, профессора Татьяны Николаевны Поповой, замечаний нет.

В дискуссии приняли участие:

доктор биологических наук, профессор Шишкин Сергей Сергеевич, заведующий лабораторией биомедицинских исследований Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

доктор биологических наук, профессор Вейко Владимир Петрович, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

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

- 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. Допускается возможность использовать Arg-содержащие дипептиды, включающие гидрофобные аминокислотные остатки, в биотехнологии и медицине вместо Arg, применяемого обычно в больших концентрациях, что не всегда приемлемо.
- В отличие от индивидуальной аминокислоты Lys, ускоряющей агрегацию модельных белков, включение Lys в состав дипептида Lys-Leu вызывает противоположный эффект – торможение процесса агрегации.
- На примерах рекомбинантного инсулина человека и α -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 pH среды в узком диапазоне физиологических значений от pH 7.0 до pH 8.0.
- На модельных белках 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 α -лактальбумина, образующихся на начальных этапах процесса агрегации под действием Arg, Lys, Arg-Phe или АСТН (1-24). Показано, что в присутствии пептидов формируются гранулярные частицы, соединяющиеся в длинные цепи или фибриллоподобные волокна, в отличие от аморфных частиц, наблюдаемых в отсутствие эффекторов.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что

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*.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

- 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, в частности перорального инсулина.
- 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.
- В работе показано, что эффекты Arg и исследуемых пептидов изменяются на противоположные (ускорение или торможение агрегации) при изменении pH среды в узком диапазоне физиологических значений от pH 7.0 до pH 8.0, что свидетельствует о возможности тонкой регуляции процесса агрегации белков.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- Использованные методики исследования корректны;
- Достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- Полученные экспериментальные закономерности являются статистически достоверными;
- Выводы, представленные в работе, логичны и полностью соответствуют результатам проведенного исследования.

Личный вклад соискателя состоит в:

- получении экспериментальных данных либо соискателем, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований.
- обработке и интерпретации экспериментальных данных;
- подготовке публикаций по выполненной работе.

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

На заседании 25 февраля 2016 года диссертационный совет принял решение присудить Агутиной Екатерине Юрьевне учёную степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 17 докторов наук, 12 докторов биологических наук, 5 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» 18, «против» нет, «недействительных бюллетеней» нет.

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

Учёный секретарь
диссертационного совета
ФИЦ Биотехнологии РАН
кандидат биологических наук



 Дзантиев Б.Б.

 Орловский А.Ф.

«25» февраля 2016 г.