



09 февраля 20 16 г.

№ 05-08/11

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе ФГАОУ ВО
«Российский университет дружбы народов»
д. ф. н., профессор

Н.С. Кирабаев
2016 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертационной работы Агутиной Екатерины Юрьевны «Образование белковых агрегатов, индуцируемое пептидами», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04. Биохимия

Исследование молекулярных механизмов ассоциации и агрегации белков представляет собой перспективное направление современной биохимии и биотехнологии. В процессе фолдинга, белки приобретают уникальную трехмерную структуру, определяющую их биологическую активность. Однако в ответ на мутации, посттрансляционные модификации или различные стрессорные воздействия происходит трансформация пространственной структуры белков и образование интермедиатов фолдинга, компетентных к агрегатообразованию. В результате формируются различные амилоидоподобные структуры, являющиеся первопричиной «конформационных болезней». В нормально функционирующей живой клетке работает система «контроля качества», включающая шапероны и протеиназы, которая предотвращает накопление белковых агрегатов. Помимо молекулярных шаперонов, влияют на конформацию склонных к агрегации

белков могут низкомолекулярные биогенные соединения. К таким соединениям относятся аминокислоты и пептиды, которые при определенных условиях вызывают конформационные изменения в белках, проявляют способность к образованию надмолекулярных структур, отличающихся широким морфологическим разнообразием. В настоящее время общепринятым считается представление о том, что формирование белками и пептидами фибриллоподобных структур является универсальным биологически обусловленным свойством полипептидных цепей и значительно более распространенным явлением в живой системе, чем предполагалось ранее. В соответствии с этой концепцией весьма актуальным представляется не только поиск агентов, индуцирующих агрегацию белков и участвующих в формировании определенных надмолекулярных структур с заданными свойствами, но также разработка механизмов регуляции этих процессов.

В работе впервые высказывается идея о том, что при разработке новых эффективных добавок, влияющих на агрегацию белков, целесообразно исследование действия аргинина, включенного в состав коротких амфифильных пептидов, проявляющих способность вступать как в электростатические, так и гидрофобные взаимодействия с развернутыми белками. Представлен большой экспериментальный материал в подтверждение того, что аргинин в составе амфифильных пептидов является 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 рН среды. В этой связи исследования молекулярных механизмов агрегации белков с учетом изменения рН весьма актуальны.

Накопленные в литературе данные о функционировании лигандов биологического происхождения, обладающих способностью индуцировать

процессы агрегации, немногочисленны и зачастую противоречивы. В настоящей работе с использованием современных высокотехнологичных приборов и методов осуществлен широкий спектр экспериментов, направленных на изучение пептид-индуцируемой агрегации модельных белковых субстратов. Впервые показано, что действие пептидов Arg-Phe и пептидного фрагмента адренокортикотропного гормона, АСТН (1-24), содержащего 3 остатка аргинина и 4 – лизина, на агрегацию модельных белков проявляется при концентрациях в 100–1000 раз меньших по сравнению с эффектами аргинина. Эти результаты свидетельствуют о возможности преимущественного использования аргинин-содержащих дипептидов, включающих гидрофобные аминокислотные остатки, в биотехнологии и медицине вместо аргинина.

На примерах рекомбинантного инсулина человека и альфа-лактальбумина коровьего молока продемонстрирована возможность изменять действия на агрегацию белков аргинина 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 аргинина, зависящие от его концентрации – ускорение агрегации белков при низких (10–100 мМ) и торможение при высоких (более 300 мМ) концентрациях.

С помощью атомно-силовой и трансмиссионной электронной микроскопии выявлены морфологические особенности структур агрегатов инсулина и альфа-лактальбумина, образующихся на начальных этапах процесса агрегации под действием аргинина, лизина и пептидов 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.

Практическая ценность представленной работы обусловлена также тем, что в ней намечается перспективное направление дальнейших исследований. Модельные амфифильные пептиды могут служить инструментом для изучения участия низкомолекулярных соединений, проявляющих как гидрофобные, так и гидрофильные свойства в процессе агрегации белков и трансформации агрегатов. 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.

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, она изложена на 145 страницах и иллюстрирована 62 рисунками. Обзор литературы посвящен описанию современных представлений об агрегации белков, молекулярных шаперонах, процессах фибриллообразования, морфологических особенностях белковых агрегатов, «функциональных амилоидах», влиянии низкомолекулярных соединений на процессы агрегации и перспективах их использования в нанобиотехнологии, а также о модельных белковых субстратах, использованных в экспериментах. Автор проделал большую работу, собрав и обобщив большой массив данных, касающихся предмета исследований. Несомненным достоинством диссертации является цитирование автором как основополагающих, так и современных работ (283 ссылки: только отечественные работы почему-то приводятся в конце, а не в начале списка). Обзор хорошо иллюстрирован, что позволяет без труда ориентироваться в проблеме.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные автором современные методы исследования, успешное сочетание которых является, безусловно, важной особенностью данной работы. В разделе «Результаты и их обсуждение» подробно рассматривается кинетика агрегации модельных белковых субстратов при различных значениях рН в отсутствие или в присутствии эффекторов – аминокислот и амфифильных

пептидов, изученная методами динамического светорассеяния, турбидиметрии и флуоресцентной спектроскопии. Представлен сравнительный анализ структурных особенностей гетерогенных белковых агрегатов, образующихся в отсутствие или в присутствии эффекторов в результате электростатических и гидрофобных взаимодействии. Результаты экспериментов позволили автору сделать вывод о том, что структурные особенности пептидов, главным образом, наличие заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков могут определять характер их влияния на процессы самоассоциации и агрегации различных белковых субстратов. Высказана гипотеза о том, что пептиды можно использовать для направленного структурирования белковых агрегатов с заданными свойствами при решении многих биотехнологических и медицинских задач. Однако для подтверждения этой гипотезы, безусловно, требуются дальнейшие исследования с использованием большого набора субстратных белков и пептидов.

Научно-практическая ценность данной работы состоит в том, что изучение действия пептидов на агрегацию развернутых белков может внести вклад в традиционные представления о молекулярных механизмах первичного ответа клетки на стресс. Кроме того, полученные результаты могут быть рекомендованы для анализа ускорения агрегации белков различными низкомолекулярными агентами с образованием гетерогенных надмолекулярных структур. Эти данные могут служить базой для дальнейшего поиска эффективных химических агентов, действующих на агрегацию рекомбинантных белков.

Результаты диссертационной работы Агутиной Е.Ю. могут быть использованы в исследованиях, проводимых в Учреждениях Российской академии наук – институте биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», на биологическом факультете и

в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, а также при чтении курсов лекций по биохимии, биофизике и молекулярной биологии. В рамках поставленных задач диссертацию Агутиной Е.Ю. можно считать завершенным исследованием. Личный вклад автора является решающим. По материалам диссертационной работы опубликованы 14 печатных работ, в том числе 5 статей в ведущих зарубежных журналах. Выводы, сделанные автором, представляются вполне обоснованными и не вызывают возражений, а содержание автореферата и опубликованных статей адекватно отражают основные положения работы. Полученные данные хорошо документированы и их достоверность не вызывает сомнений.

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. Тем не менее, высказанные замечания не снижают общей высокой оценки диссертационной работы Е.Ю. Агутиной.

Таким образом, по уровню научной значимости полученных результатов, по их новизне и оригинальности диссертационная работа

«Образование белковых агрегатов, индуцируемое пептидами», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор, Агутина Екатерина Юрьевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв заслушан и одобрен на заседании кафедры биохимии РУДН 22 января 2016 г. Протокол № 4 от 22.01.2016 г.

Доцент кафедры биохимии

им. академика Т.Т. Березова МИ РУДН, к.б.н.

Рыскина Е.А.

Заведующий кафедрой биохимии

им. академика Т.Т. Березова МИ РУДН

д.б.н., профессор

Чернов Н.Н.

Директор Медицинского института РУДН

д.м.н

ФГАОУ ВО «РУДН»

Адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6,

Тел. (495) 433-53-00, e-mail: rector@rudn.ru



Абрамов А.Ю.