

## **Отзыв**

**официального оппонента на диссертационную работу  
Агутиной Екатерины Юрьевны  
«Образование белковых агрегатов, индуцируемое  
пептидами»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности 03.01.04 –  
биохимия**

Изучение белок-белковых взаимодействий является одним из фундаментальных направлений современной биохимии. Особый интерес вызывают проблемы, связанные с «некорректным» фолдингом и агрегацией белков. Известно, что в ответ на мутации, посттрансляционные модификации или изменения локальных условий (тепловой, осмотический и окислительный стрессы, облучение ультрафиолетом, критическое изменение pH) белковые молекулы могут претерпевать трансформацию вторичной и третичной структур. Подобные изменения приводят к образованию как аморфных, так и высокоструктурированных фибриллоподобных агрегатов. Широкий спектр условий, приводящих к формированию белковых структур, склонных к самоассоциации, диктует необходимость исследования молекулярных механизмов процессов агрегатообразования и их регуляции. Это особенно актуально в связи с тем, что, согласно современным представлениям, патогенез большого числа нейродегенеративных заболеваний человека (болезней Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, прионных энцефалопатий и др.), названных «конформационными болезнями», связан с накоплением агрегированных белков, подвергнутых структурным перестройкам.

Однако было обнаружено, что при агрегации множества непатогенных белков и пептидов образуются структуры, морфологически сходные с

агрегатами, выявленными при различных патологических состояниях. Кроме того, накоплено большое число фактов, свидетельствующих о том, что белковые агрегаты могут быть функционально активными и выполнять определенную биологическую роль в живой системе. В этой связи весьма актуальным представляется поиск биогенных агентов, естественно присущих биологическим системам, способных влиять на конформацию компетентных к агрегации белков, а также участвовать в трансформации агрегатов. В качестве подобных соединений представляют интерес аминокислоты и пептиды, которые при определенных условиях могут выступать в роли регуляторов процесса агрегатообразования.

Большое внимание уделяется аргинину, который широко применяется при производстве рекомбинантных белковых препаратов в биотехнологических процессах в качестве шапероноподобного агента для предотвращения агрегации белков и обеспечения их биологически активного состояния. Однако в большинстве случаев аргинин активен в больших концентрациях, что накладывает определенные ограничения на его использование. Поэтому необходима разработка новых эффективных добавок, влияющих на агрегацию белков при более низких концентрациях.

В этой связи представленную диссертационную работу Е.Ю. Агутиной можно считать весьма актуальной, поскольку в ней высказывается идея о целесообразности исследования действия аргинина, включенного в состав коротких пептидов, проявляющих способность вступать как в электростатические, так и гидрофобные взаимодействия с развернутыми белками. При этом предполагается, что аргинин в составе амфифильных пептидов может быть более эффективным защитным агентом, предотвращающим белковую агрегацию, по сравнению со свободным аргинином. Диссертационная работа посвящена изучению условий и механизмов взаимодействия пептидов с развернутыми в денатурирующих условиях белками, компетентными к агрегации. В качестве объекта

исследования выбраны модельные пептиды, которые могут служить инструментом для изучения защитных функций низкомолекулярных соединений биологического происхождения при агрегации белков. Следует отметить, что в настоящее время данные о функционировании пептидов, которые обладают способностью участвовать не только в торможении, но и в ускорении процессов агрегации и образовании надмолекулярных структур, весьма ограничены.

Диссертация построена по общепринятой схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающей 283 ссылки. Работа изложена на 145 страницах печатного текста и иллюстрирована 62 рисунками.

Во введении хорошо обоснована актуальность проведенного исследования, четко обозначены цель и задачи работы. Обзор литературы содержит современные сведения о механизмах агрегации белков и процессах фибриллообразования, морфологических особенностях белковых агрегатов и перспективах их использования в биотехнологии и медицине, влиянии шаперонов и низкомолекулярных соединений на процессы агрегации, «функциональных амилоидах». Обзор литературы включает ссылки на публикации самых последних лет, богато иллюстрирован цветными рисунками и схемами, читается с интересом и наглядно свидетельствует о том, что диссертант ориентируется в публикациях по вопросам, относящимся к теме диссертации. Тем не менее, 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.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные автором современные методы исследования (динамическое светорассеяние,

флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, электронная и атомно-силовая микроскопия и др.). Успешное сочетание различных методов позволили автору провести оригинальное исследование и получить важные результаты, имеющие теоретическую и практическую значимость.

В основной части диссертационной работы Е.Ю. Агутиной представлены экспериментальные данные по кинетике агрегации модельных белковых субстратов (рекомбинантного инсулина человека, альфа-лактальбумина коровьего молока и др.) в отсутствие или в присутствии аргинина, лизина и амфифильных пептидов, полученные, главным образом, методом динамического светорассеяния. Выбор этого метода обусловлен тем, что он позволяет регистрировать не только интенсивность светорассеяния, но и размеры частиц, образующихся в процессе агрегации.

Результаты данной работы представляют интерес новизны. Показано, что при действии Arg- и Lys-содержащих пептидов, Arg-Phe, Lys-Leu и пептидного фрагмента адренокортикотропного гормона АСТН (1-24), на агрегацию модельных белков для снижения начальной скорости процесса агрегации в два раза требуются концентрации пептидов, в 100–1000 раз меньшие, по сравнению с эффектами аргинина. Эти результаты позволили автору сделать предположение о возможности преимущественного использования Arg-содержащих дипептидов, включающих гидрофобные аминокислотные остатки, вместо аргинина при разработке новых эффективных добавок в биотехнологии при получении рекомбинантных белков, а также при создании белковых препаратов медицинского назначения.

Кроме того, на модельных белках 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, что свидетельствует о возможности тонкой регуляции процесса агрегации белков. 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 использованием электронной и атомно-силовой микроскопии проведен сравнительный анализ структурных особенностей белковых агрегатов, образующихся в отсутствие или в присутствии различных эффекторов. Показано, что на начальном этапе агрегации белки в присутствии пептидов формируют гранулярные частицы, соединяющиеся в длинные цепи или фибриллоподобные волокна, в отличие от аморфных агрегатов, наблюдаемых в отсутствие эффекторов.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что диссертация Е.Ю. Агутиной посвящена актуальной и интересной проблеме, выполнена на высоком современной уровне и содержит новые оригинальные экспериментальные результаты. Диссертационная работа включает наглядно оформленные материалы и написана хорошим научным языком. Все полученные данные документированы, их достоверность не вызывает сомнений. Окончательные выводы полностью основаны на экспериментальных данных и не вызывают возражений.

Однако 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.

К несомненным достоинствам работы следует отнести то, что в ней просматривается ряд перспективных направлений будущих исследований по изучению влияния аргинина и пептидов на компетентные к агрегации белки. В частности, использование ЯМР-спектроскопии в данной работе для исследования конформации рекомбинантного инсулина человека в растворе и его последующих структурных перестроек в результате взаимодействия с аргинином представляется весьма актуальным. Хотя одномерная спектроскопия  $^1\text{H}$  ЯМР не позволяет получить необходимую информацию о том, какие именно аминокислотные остатки в молекуле рекомбинантного инсулина человека являются непосредственными мишенями действия аргинина, корреляция результатов проведенных экспериментов с данными, полученными другими методами, убедительно показана в диссертации. Следовало бы включить эти результаты в автореферат.

Однако высказанные замечания носят полемический характер и не влияют на общее положительное впечатление от этой интересной работы. Хорошим свидетельством ее высокого качества является тот факт, что результаты исследований Е.Ю. Агутиной отражены в 5 статьях, опубликованных в ведущих рецензируемых международных журналах, они были представлены на многих отечественных конференциях. Автореферат и публикации полностью отражают основное содержание диссертационной работы.

Все сказанное позволяет заключить, что диссертационная работа представляет собой завершённое научное исследование. По актуальности

выбранной темы, степени обоснованности научных положений, достоверности полученных данных и выводов, новизне, теоретической и практической значимости представленная диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор, Агудина Екатерина Юрьевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент

Векшин Николай Лазаревич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, лаборатория внутриклеточной сигнализации, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник

Адрес: 142290 г.Пущино, ул. Институтская-3, ИБК РАН.

тел. (968) 792-21-41 e-mail: nvekshin@rambler.ru

Дата 0.3.02.2016

Подпись д.б.н., в.н.с. Векшина Н.Л. заверяю

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук

Дата 03.02.2016г.

Удостоверенный секретарь ИБК РАН  
в.с. Макушина

