

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Екатерина Юрьевна Агутиной
«ОБРАЗОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ, ИНДУЦИРУЕМОЕ ПЕПТИДАМИ»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.04 – «Биохимия»**

Актуальность темы диссертация Е.Ю. Агутиной не вызывает никаких сомнений, поскольку она посвящена одной из очень популярных в настоящее время тем – изучению влияния пептидов на агрегацию белков. Агрегация белков, особенно амилоидная, вовлечена в индукцию и развития многих заболеваний. При этом, если изучению роли амилоидных структур в развития нейродегенеративных заболеваний посвящено огромное количество работа, то публикаций о других амилоидозах существенно меньше. В связи с этим важны результаты работы, в которых объектом исследования являются особенности агрегации инсулина. Не менее актуальным является изучение механизмов действия различных пептдов на агрегацию белков. Особое значение этот аспект приобретает в связи со все большим использованием различных пептидов для профилактики и лечения всевозможных заболеваний. Как правило, при применении пептидов в лечебных целях механизмы их действия остаются неизвестными. В рецензируемой работе основное внимание уделено именно скрупулезному исследованию влияния заряда пептида, его гидрофобности, особенностей структуры на агрегацию нескольких модельных белков, отличающихся по структуре и функциональному значению. Конечно, на все вопросы невозможно ответить даже при проведении такой фундаментальной работы, но она, безусловно важна, как для понимания механизмов агрегации белков и влияния пептидов и отдельных аминокислот на этот процесс.

Диссертация Е.Ю. Агутиной изложена на 145 стр. и состоит следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, и список цитированной литературы (283 ссылки). Работа хорошо иллюстрирована 62 рисунками.

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».

По обзору литературы есть несколько небольших замечаний. Одно, уже ставшее для меня традиционным при написании отзывов. 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 RV, Klibanov AM. Correct protein folding in glycerol. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Dec 9;94(25):13520-3). Непонятно по каким причинам в списке литературы идут сначала ссылки на международные журналы, а потом на отечественные. Всегда первыми были ссылки на отечественные публикации.

На основании результатов, полученных в рамках данной работы, представляется целесообразным снижение локальных значений щелочного pH, манипулируя средой кишечника, что может влиять на заряд инсулина и его участие в электростатических взаимодействиях с положительно заряженными молекулами окружающей среды [Smirnova et al., 2014, 2015]. Можно также предложить ограничения потребления аргинина и лизина в качестве диетических добавок с целью стандартизации пероральной системы доставки инсулина больным диабетом. Кроме того, включение в препараты инсулина отрицательно заряженных белков в качестве дополнительных мишеней для противоположно заряженных эффекторов и протеолитических ферментов представляется целесообразным.

Итак, полученные результаты могут быть использованы при создании белковых препаратов медицинского назначения, при разработке новых эффективных добавок в

биотехнологии при получении рекомбинантных белков, а также при фундаментальных исследованиях функционирования инсулина в живой системе.

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 [Shah et al., 2012]. 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.

Дипептиды Arg-Phe и Lys-Leu и пептидный фрагмент адренокортикотропного гормона (АСТН 1-24) проявляют концентрационно-зависимое защитное действие на агрегацию модельных белков, индуцируемую дитиотреитолом, однако, при концентрациях, в 100–1000 раз меньших по сравнению с аргинином. Эффекты аргинина и пептидов Arg-Phe, Lys-Leu и АСТН (1-24) можно изменять на противоположно направленные (торможение или ускорение агрегации) путем изменения pH среды в узком

диапазоне физиологических значений от pH 7.0 до pH 8.0. Действие дипептидов Arg-Phe и Asp-Phe на агрегацию модельных белков зависит от их заряда; наблюдается ускорение агрегации противоположно заряженных, но торможение агрегации одноименно заряженных белков. Выявлены морфологические особенности агрегатов модельных белков, образующихся на начальных этапах процесса агрегации под действием Arg, Lys, Arg-Phe или АСТН (1 24). В присутствии пептидов формируются гранулярные частицы, соединяющиеся в длинные цепи или фибриллоподобные волокна, в отличие от аморфных агрегатов, наблюдаемых в отсутствие эффекторов.

Хорошее впечатление производит методический раздел работы. Этот раздел позволяет сделать вывод, что автор овладел многими методами, хорошо в них разбирается, умеет обработать результаты многообразных экспериментов.

В разделе «Результаты и их обсуждение» понятно и логично изложена полученная автором информация. Можно полагать, что в самой структуре Arg заложена тенденция к проявлению разнонаправленного (подавляющего или ускоряющего) действия на агрегацию белков. Поскольку Arg преимущественно взаимодействует с отрицательно заряженными и ароматическими аминокислотными остатками белков [Shah et al., 2012], ускорение агрегации может происходить в результате экранирования отрицательных зарядов белка и торможения их взаимного отталкивания, а подавление агрегации может быть следствием связывания Arg с ароматическими сайтами белка, которые становятся недоступными для самоассоциации развернутых белков.

Для сравнения эффектов Arg и Arg-Phe была исследована также кинетика агрегации инсулина после добавления в инкубационную смесь Arg, или Arg-Phe, или буфера (для контрольных проб) по истечении 15 мин после начала инкубации. Показано, что 1 мМ Arg-Phe вызывает увеличение интенсивности светорассеяния и размеров агрегатов в большей степени, чем 100 мМ Arg. Однако после внесения в инкубационную смесь буфера процесс агрегации заметно тормозился

По данному разделу есть несколько небольших вопросов и замечаний.

Безусловно, сделанные замечания не умаляют ценности сделанной работы.

Таким образом, можно с уверенностью сказать, что Е.Ю. Агутиной была проведена большая, интересная и важная как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте работа. Основные результаты работы изложены в диссертации и опубликованы в

журналах из списка ВАК, а сделанные автором выводы соответствуют полученным результатам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Екатерины Юрьевны Агутиной «ОБРАЗОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ, ИНДУЦИРУЕМОЕ ПЕПТИДАМИ», является законченным квалификационным научным исследованием и по содержанию полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 N 842, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Екатерина Юрьевна Агутина заслуживает присуждения искомой степени по специальности: 03.01.04 – биохимия.

Владимир Израилевич Муронец
доктор биологических наук, профессор,
заведующий отделом биохимии животной клетки
Научно-исследовательского института физико-химической
биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова
Контактный телефон: +7(495)939-14-56
Рабочий адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40
E-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru

« 08 » февраля 2016г.



Подпись В.И. Муронца заверяю
Директор научно-исследовательского института
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова

академик, профессор

В.П.Скулачев

