

ОТЗЫВ

научного руководителя, доктора биологических наук, доцента, декана
биологического факультета Белорусского государственного университета

Хрусталёва Владислава Викторовича на диссертацию

Акуневич Анастасии Александровны

«Эпидермальный фактор роста с аминокислотной заменой: разработка и оценка
биологической активности»,

представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 – биохимия

В последнее время тенденция развития структурной биологии предполагает определение трёхмерной структуры молекул, в том числе белков, по принципу «во что бы то ни стало». Для этого используются крайне производительные методы: рентгеноструктурный анализ, ЯМР-спектроскопия в растворе белка, криоэлектронная микроскопия. Банк данных полнится структурами, и мы на них опираемся в каждой работе по специальности «биохимия». Но этот подход приводит к тому, что исследователи начинают получать структуру ради структуры. Для того, чтобы получить чёткую картину расположения всех атомов в молекуле, им приходится менять условия, при которых проводится эксперимент. Для получения устойчивой структуры изменяют температуру и pH, а также используют специфические буферные растворы, модификации молекул, создают комплексы белков с другими соединениями, в том числе, с моноклональными антителами. Таким образом, структурная биология уходит в область самоцели. Но в данном исследовании Акуневич А.А. приблизилась к тому, чтобы изучить структуру пептида в условиях, наиболее подходящих под критерии физиологических. Таким образом, выяснилось, что структура EGF весьма изменчива и формирование её зависит от многочисленных факторов внешней среды, вплоть до связывания с хлорид-ионами.

Научная новизна работы обусловлена, в первую очередь, тем, что впервые был использован такой принцип дизайна новых соединений белковой природы,

обладающих биологической активностью, как внесение небольших изменений в структуру природных сигнальных молекул. Таким образом, всего лишь одна или две аминокислотные замены были внесены непосредственно в нативный фактор роста эпидермиса человека. Этот принцип заслуживает внимания, так как, с одной стороны, введение таких молекул в организм не должно вызывать токсического эффекта, что было доказано соискателем в экспериментах на мышах, а с другой стороны, мутантная сигнальная молекула должна связываться с рецептором, но при этом не запускать сложный механизм передачи информации. Собственно, в результате работы Акунович А.А. доказала, что агонистическая активность мутантной формы пептида была ниже, чем у нативного.

Нельзя не отметить парадоксальность эффекта от замены остатка аспарагиновой кислоты на остаток глицина. Обычно глицин выступает в роли шарнирного остатка, при дающего полипептидной цепи повышенную подвижность. В случае такой замены в 46-м положении эпидермального фактора роста человека процент остатков в бета-структуре неожиданно увеличился, а стабильность димеров существенно возросла. Такие последствия данной замены были предсказаны с помощью вероятностного метода, учитывающего способность фрагментов полипептидной цепи переходить во внутренне неупорядоченное состояние.

На пути исследования мутантной формы эпидермального фактора роста соискателем были получены абсолютно новые данные о структурных переходах нативной формы под воздействием температуры и изменения редокс-потенциала.

Анастасия Александровна была заинтересована в исследованиях в области биотехнологии ещё будучи студенткой пятого курса фармацевтического факультета Белорусского государственного медицинского университета. Спустя несколько лет, после окончания магистратуры, ближе к финальному этапу выполнения диссертации, на третьем году аспирантуры, работа перетекла в чисто биотехнологическое русло, но не на клетках, а в бесклеточной системе синтеза белка. Интересен сам факт того, что в природе эпидермальный фактор роста синтезируется в виде белка-предшественника, из которого путём протеолиза

вырезается фрагмент, который становится активным EGF. Однако в системе бесклеточного синтеза белка был реализован процесс, при котором синтезируется не пробелок, а сразу его активная форма с дополнительным N-концевым остатком метионина, который соответствует стартовому кодону. Таким образом, соискатель параллельно выяснила роль N-конца в формировании пространственной структуры.

На интерпретацию результатов, полученных в диссертации, оказала существенное влияние преподаваемая Анастасией Александровной учебная дисциплина (медицинская химия, включающая основы физической химии), потому что на протяжении всей работы она упоминает о равновесных состояниях. Получается, что разные структурные формы пептида сосуществуют в одном и том же растворе в состоянии равновесия, что можно было уловить исключительно с помощью использованных ей спектральных методов исследования.

Количество методов, освоенных Акунович А.А. за время работы над кандидатской диссертацией, впечатляет. Ею использованы методы предсказательного характера, то есть, методы *in silico* биологии, на основе результатов которых был осуществлён отбор той самой замены, которая в дальнейшем изучалась. Затем ею был использован широкий спектр методов анализа *in vitro*, включая ИК-спектроскопию, КД-спектроскопию, флуоресцентный анализ, основанный на собственной флуоресценции остатков триптофана, нативный ПААГ-электрофорез. И, наконец, ею также были использованы методы исследования биологической активности в культуре клеток и *in vivo* с использованием модели карциномы Эрлиха на мышах. Таким образом, квалификационные требования выполнены в полной мере.

Работа выполнена в рамках грантов БРФФИ по соответствующим темам: «Разработка антагониста рецептора эпидермального фактора роста на основе модифицированного фактора роста эпидермиса» (договор № Б20М-025 от 04.05.2020, № гос. регистрации 20201208, срок выполнения: 04.05.2020–31.03.2022), «Выявление структурно-динамических особенностей мутантных форм белка-предшественника бета-амилоидов методами молекулярного моделирования

и спектрального анализа» (договор № Б21РМ-046 от 01.07.2021, № гос. регистрации 20213474, срок выполнения: 01.07.2021– 31.05.2023), а также в рамках инициативной НИР кафедры общей химии БГМУ «Изучение особенностей лиганд-рецепторных взаимодействий с помощью разработанного способа выявления участков белков с нестабильной вторичной структурой» (№ гос. регистрации 20210135 от 16.02.2021, срок выполнения: 01.01.2021–31.12.2025).

Научные результаты диссертации опубликованы в 7 статьях в рецензируемых научных журналах: одна в журнале «Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук», одна в журнале «Биохимия и молекулярная биология», одна в «Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy», две статьи в «The Protein Journal», две статьи в «Protein & Peptide Letters».

Диссертация Акуневич А.А. является законченным научным исследованием, по своей цели задачам, методам исследования, опубликованности результатов полностью отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Акуневич А.А. достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук за:

- доказательство существования эпидермального фактора роста человека в водном растворе при $\text{pH} = 7,4$ и температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в состоянии равновесия между димерной и мономерной формой;
- доказательство того, что диссоциация димеров эпидермального фактора роста происходит при контакте с III доменом их клеточного рецептора;
- доказательство структурной изменчивости эпидермального фактора роста: частичной потери вторичной структуры в водном растворе при $\text{pH} = 7,4$ и температуре от $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- описание структурных последствий замены D46G в эпидермальном факторе роста человека: удлинение и перестройка межмолекулярной β -структуры, повышение устойчивости димеров к разбавлению и нагреванию до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, предотвращение структурного перехода,

характерного для нативной формы в водном растворе при $pH = 7,4$ и температуре от $35^{\circ}C$ до $40^{\circ}C$;

- описание структурных последствий восстановления дисульфидных связей в эпидермальном факторе роста человека: повышение устойчивости димеров к разбавлению и нагреванию за счёт образования дополнительной бета-структуры;
- доказательство наличия у синтетического эпидермального фактора роста с заменой D46G свойств частичного агониста рецептора эпидермального фактора роста как в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека, так и в модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей;
- получение рекомбинантной формы эпидермального фактора роста с заменой D46G и с дополнительным N-концевым остатком метионина с помощью системы бесклеточного синтеза белка, установление его строения и доказательство биологической активности в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека.

Научный руководитель

доктор биологических наук, доцент,

декан биологического факультета

Белорусского государственного

университета

Хрусталёв В.В.

