

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Акуневич Анастасии Александровны

«Получение, структурная характеристика и оценка биологической активности эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите

Диссертация Акуневич А.А. посвящена разработке мутантной формы человеческого эпидермального фактора роста со сниженной агонистической активностью, анализу его пространственной структуры и оценке его биологической активности в культуре опухолевых клеток и модели солидной опухоли у лабораторных мышей. Исходя из этого, диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.04 – биохимия, утверждённого приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 23.04.2018 № 116, а именно пунктам:

3.1 в части «вопросы строения, свойств, образования и функциональной активности аминокислот, пептидов, белков. Протеом и протеомика»;

3.3 в части «выделение и реконструирование молекулярных ансамблей. Моделирование биохимических процессов *in vitro* и *in silico*»;

3.4 в части «Термодинамические расчёты на уровне функционирования отдельных молекул, компьютерное моделирование пространственной структуры биополимеров и надмолекулярных комплексов. Молекулярный докинг»;

3.6 в части «паракринная и аутокринная сигнализация. Поверхностные рецепторы, их агонисты и антагонисты»;

3.12 в части «частичный и полный синтез природных соединений и их аналогов»;

3.15 в части «создание белков с заданной специфичностью, выяснение их физиологического действия, установление взаимосвязи «структура-функция» и возможностей применения полученных веществ».

Диссертация соответствует биологической отрасли наук, исходя из объекта (человеческий эпидермальный фактор роста, его мутантная форма и их комплексы с рецептором), и предмета исследования (нуклеотидные и аминокислотные последовательности EGF-подобных факторов роста, модели пространственной структуры эпидермального фактора роста и его мутантной формы, межмолекулярные взаимодействия в комплексах EGF-подобных факторов роста и EGFR, спектры флуоресценции и кругового дихроизма, ИК

спектры синтетических пептидов эпидермального фактора роста и его мутантной формы, активность эпидермального фактора роста и его мутантной формы в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека, активность эпидермального фактора роста и его мутантной формы в модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у животных).

Актуальность темы диссертации

Лекарственная резистентность эпителиальных опухолей является актуальной проблемой фармакотерапии, что требует разработки новых противоопухолевых препаратов. Используемые в настоящее время моноклональные антитела, связывающие внеклеточные домены рецептора эпидермального фактора роста, и ингибиторы тирозинкиназного домена данного рецептора обладают клинической эффективностью. Однако их применение приводит к вторичной резистентности опухоли к терапии по причине мутаций в лиганд-связывающих доменах. В связи с этим соискателем был выбран подход направленного изменения структуры нативного лиганда данного рецептора – эпидермального фактора роста – за счёт внесения в его первичную структуру аминокислотной замены, способной снизить его агонистическую активность. Следует отметить, что ранее другими исследователями предпринимались попытки создания мутантных форм данного пептида с повышенной агонистической активностью и перспективой применения в области тканевой инженерии и регенеративной медицины. Напротив, мутантные формы эпидермального фактора роста со сниженной или полностью отсутствующей агонистической активностью до сих пор не были разработаны. Такие лиганды с сохранёнными сайтами связывания внеклеточных доменов рецептора, но с модифицированной аминокислотной последовательностью могут быть полезны в терапии резистентных опухолей с мутациями во внеклеточных доменах рецептора в областях, связывающих анти-EGFR моноклональные антитела, что обуславливает актуальность диссертационной работы для практической медицины.

Несмотря на наличие большого количества трёхмерных структур эпидермального фактора роста в базе данных PDB (банка данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот), до настоящего времени не получены данные о динамике полноразмерного эпидермального фактора роста в растворе при физиологических значениях температуры и pH. Также имеется ограниченное количество данных о димеризации эпидермального фактора роста и влиянии внешних факторов на этот процесс, что в свою очередь имеет значение для понимания механизмов взаимодействия лиганда с рецептором. Таким образом, для достижения цели исследования

соискателю также необходимо было решить приведённые задачи, что обуславливает актуальность диссертационной работы для фундаментальной науки.

Кроме того, тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 гг., утверждённым Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 № 156, а именно пункту «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства», подпунктам «Биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные)», «Системная и синтетическая биология», «Тонкий химический синтез», а также пункту «Цифровые информационно-коммуникационные и междисциплинарные технологии, основанные на них производства», подпункту «Математика и моделирование сложных функциональных систем (технологических, биологических, социальных)».

Степень новизны результатов диссертации и научных положений, выносимых на защиту

Впервые установлено, что при физиологическом значении pH для эпидермального фактора роста характерна структурная изменчивость в диапазоне температур от 35 °C до 40 °C, что приводит к снижению содержания бета-структуры.

Впервые получена мутантная форма эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой D46G в его С-концевом фрагменте. При этом абсолютно новыми являются данные о его строении и биологической активности. Установлено, что для димеров мутантной формы пептида характерно удлинение межмолекулярной бета-структуры в сравнении с его нативной формой, что делает их более устойчивыми к диссоциации под действием внешних факторов, таких как повышение температуры и разбавление раствора. Установлено, что данные структурные изменения снижают аффинность пептида к третьему домену его рецептора и приводят к последующему снижению агонистической активности вышеуказанного пептида.

Впервые установлено, что при полном восстановлении дисульфидных связей в структуре нативной формы эпидермального фактора роста происходит удлинение бета-структур и повышение устойчивости димеров восстановленного эпидермального фактора роста к диссоциации.

Впервые получена рекомбинантная форма эпидермального фактора роста с заменой D46G с помощью системы бесклеточного синтеза белка, пространственная структура и биологическая активность которого

сопоставима с таковыми синтетического пептида с нативной аминокислотной последовательностью.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций определяется следующими фактами:

1. Для дизайна мутантной формы эпидермального фактора роста использованы современные биоинформационные методы, включающие филогенетический анализ, анализ стабильности вторичной структуры пептида, моделирование пространственной структуры пептида, макромолекулярный докинг.

2. Использование спектроскопических методов анализа (флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, инфракрасная спектроскопия), подходящих для изучения динамических равновесий в структуре исследуемого пептида, в том числе под влиянием внешних факторов (изменение температуры, разбавление, восстановление дисульфидных связей). В работе использовались пептиды с нативной и изменённой аминокислотной последовательностью, полученные методом твёрдофазного синтеза белка, а также рекомбинантная форма мутантного эпидермального фактора роста. Установление пространственной структуры мутантной формы эпидермального фактора роста выполнено в сравнении с пространственной структурой нативной формы эпидермального фактора роста.

3. Для определения порядка олигомеров пептидов использованы биохимические методы, позволяющие установить четвертичную структуру пептидов при физиологическом значении pH (голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле, центробежная ультрафильтрация).

4. Биологическая активность мутантного эпидермального фактора роста *in vitro* и *in vivo* установлена с помощью стандартных методов (в работе использованы культура клеток эпидермоидной карциномы человека и экспериментальная модель солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у лабораторных мышей).

5. Полученные данные проанализированы с использованием общепринятых методов параметрической и непараметрической статистики.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость с указанием рекомендаций по их использованию

Научная значимость результатов диссертации заключается в создании мутантной формы эпидермального фактора роста со сниженной

аффинностью к третьему домену рецептора и сниженной агонистической активностью, а также структурным обоснованием наблюдаемых биологических эффектов. Установлено влияние температуры, разбавления раствора, изотонических условий и восстановления дисульфидных связей на диссоциацию димеров нативной и мутантной формы эпидермального фактора роста. Впервые продемонстрировано, что получение мутантной формы эпидермального фактора роста возможно с помощью системы бесклеточного синтеза белка, при этом структура и активность такой рекомбинантной формы сопоставима с синтетической.

Практическая значимость исследования состоит в возможности использования полученного пептида для создания новых таргетных препаратов на основе нативных лигандов рецептора эпидермального фактора роста, структура которых модифицирована с помощью аминокислотных замен, что в перспективе способствует преодолению резистентности к противоопухолевой терапии. Разработанный синтетический эпидермальный фактор роста с заменой D46G рекомендован для дальнейших научных исследований в ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» (1 акт о внедрении). Применяемый в диссертации подход к анализу структуры синтетических пептидов при изменении внешних условий был также использован для исследования структуры фрагментов белков парвовируса В19 в рамках задания ГПНИ и используется в учебном и научном процессе кафедры общей химии БГМУ (1 акт о внедрении).

Экономическая значимость исследования заключается в перспективе снижения стоимости разработки новых антагонистов рецепторов за счёт использования комплексного подхода, интегрирующего методы компьютерного моделирования, спектроскопии и традиционные биохимические методы.

Социальная значимость результатов диссертации определяется вкладом работы в решение проблемы терапии опухолевых заболеваний, а также повышением уровня фундаментальной подготовки по химическим и медико-биологическим дисциплинам студентов медицинских вузов за счёт внедрения новых знаний о межмолекулярных взаимодействиях в комплексах рецептора с нативной и мутантной формами лиганда, а также о динамических равновесиях эпидермального фактора роста при физиологических значениях рН и температуры. Имеется 3 акта о внедрении в учебный процесс кафедры общей химии БГМУ.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Представленные в диссертации результаты опубликованы в 18 научных работах (7,81 авторских листа), из них 6 статей в рецензируемых научных

журналах (5,69 авторских листа), соответствующих пункту 19 Положения о присуждении учёных степеней и присвоении учёных званий (в 3 статьях соискатель является первым автором), 1 статья в отечественном научном журнале (0,37 авторских листа) (соискатель также является первым автором), 5 статей в сборниках научных статей и материалов конференций (1,16 авторских листа), 6 тезисов докладов (0,59 авторских листа).

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертация оформлена в соответствии с Инструкцией о порядке оформления диссертации, диссертации в виде научного доклада, автореферата диссертации и публикаций по теме диссертации, утверждённой постановлением Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 28.02.2014 № 3 (в редакции постановления Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 22.08.2022 № 5).

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов (глава 2), трёх глав с анализом результатов собственных исследований (главы 3–5), заключения, списка использованных источников (включающего библиографический список и список публикаций соискателя) и 5 приложений.

Полный объём диссертации составляет 168 страниц, из которых 100 страниц занимает печатный текст. Диссертация содержит 25 рисунков, 8 таблиц и 10 страниц приложений. Список использованных источников, содержащий 240 наименований литературных источников (включая 18 работ соискателя), составляет 22 страницы.

Список использованных источников оформлен в соответствии с приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 25.06.2014 № 159 (в редакции приказа Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь 01.10.2024 № 230). Ссылки на источники приведены в тексте диссертации корректно с указанием номеров страниц.

Замечания и вопросы по диссертации

Диссертация и автореферат написаны научным языком, достаточно полно, логически и хорошо проиллюстрированы. Причем, невзирая на значительное количество материала, работа хорошо воспринимается. Принципиальных замечаний к работе нет, но в процессе рецензирования диссертации возникли некоторые замечания и вопросы дискуссионного характера:

1. Подвергается ли эпидермальный фактор роста посттрансляционным модификациям?

2. Почему экспериментальным путём устанавливали степень сродства эпидермального фактора роста и его мутантной формы исключительно к изолированному третьему домену рецептора?

3. Что нового привнесла работа в понимание молекулярного механизма связывания эпидермального фактора роста с рецептором?

4. Можно ли говорить о практическом потенциале созданного мутантного эпидермального фактора роста, если он обладает только статическим воздействием на опухолевые клетки, но не приводит к их апоптозу?

Приведённые выше вопросы носят уточняющий характер и не уменьшают научную и практическую значимость работы.

Соответствие научной квалификации соискателя учёной степени, на которую он претендует

Оценка содержания диссертационной работы, её цели и задач, количества освоенных и использованных соискателем методов анализа, научной новизны, теоретической и практической значимости полученных результатов, их анализа и интерпретации, выводов, а также опубликованности результатов в отечественных и зарубежных научных изданиях позволяет сделать вывод о соответствии научной квалификации соискателя учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Заключение

Диссертация Акуневич Анастасии Александровны «Получение, структурная характеристика и оценка биологической активности эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, и является завершённой квалификационной научной работой, содержащей новые научные результаты о динамических структурных изменениях, происходящих в нативной форме эпидермального фактора роста при физиологическом значении pH, а также влиянии замены D46G на пространственную структуру эпидермального фактора роста и его биологическую активность в культуре опухолевых клеток и экспериментальной модели опухоли у лабораторных мышей.

Учёная степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия может быть присуждена Акуневич Анастасии Александровне за:

– установление структурных особенностей полноразмерного синтетического эпидермального фактора роста в водном растворе при физиологическом значении pH и температуры, а именно установление факта преобладания димерных форм пептида и частичной потери его вторичной структуры при нагревании от 35 °С до 40 °С;

– разработку мутантной формы эпидермального фактора роста с заменой D46G, димеры которого характеризуются большей ригидностью полипептидной цепи и удлинённой межмолекулярной бета-структурой в сравнении с нативной формой;

– установление влияния внешних факторов (повышение температуры, разбавление раствора, восстановление дисульфидных связей, изотонические условия) на диссоциацию димеров нативной и мутантной формы эпидермального фактора роста;

– установление факта отсутствия у синтетического эпидермального фактора роста с заменой D46G токсических эффектов у мышей линии Af и наличия свойств частичного агониста за счёт сниженной аффинности к третьему домену его рецептора, что приводит к замедлению пролиферации клеток эпидермоидной карциномы человека в сравнении с нативной формой пептида и торможению формирования солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей линии C57BL/6;

– получение рекомбинантного эпидермального фактора роста с заменой D46G с помощью системы бесклеточного синтеза белка, пространственная структура и биологическая активность которого сопоставима с синтетическим эпидермальным фактором роста с заменой D46G.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук, доцент,
профессор кафедры фундаментальной и
прикладной биологии учреждения
образования «Витебский государственный
университет имени П. М. Машерова»

5. 06 .2025 г.

Д.Д. Жерносеков



Подпись удостоверяю
Начальник отдела кадров
Е.П. Соловьёва

05.06.2025