

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Акуневич Анастасии Александровны

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

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

Диссертация Акуневич Анастасии Александровны «Получение, структурная характеристика и оценка биологической активности эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой» выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» под научным руководством Хрусталёва Владислава Викторовича, доктора биологических наук, доцента, декана биологического факультета Белорусского государственного университета и посвящена разработке метода синтеза полноразмерных мутантных форм эпидермального фактора роста (EGF), блокирующих активацию соответствующего рецептора (EGFR), которые предполагается использовать в качестве агентов для терапии опухолей. Одновременно автором проведено выяснение структуры, взаимодействия с рецептором и канцеростатической активности эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой.

Анализ содержания и характера диссертации, автореферата, публикаций, используемых методов исследования и выводов показывает, что диссертационное исследование Акуневич Анастасии Александровны «Получение, структурная характеристика и оценка биологической активности эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой» полностью соответствует отрасли «биологические науки» и специальности 03.01.04 – биохимия, по которым диссертация представлена к защите. Исследование, направленное на разработку методов синтеза, оценку структурной организации и биологической активности мутантных форм эпидермального фактора роста, соответствует Паспорту специальности 03.01.04 – биохимия, утвержденному приказом Высшей аттестационной комиссии № 116 от 23 апреля 2018 г.: «Вопросы строения, свойств, образования, метаболизма и функциональной активности аминокислот, пептидов, белков, нуклеиновых кислот и их компонентов, простых углеводов и полисахаридов, липидов, гормонов, витаминов» (пункт 1), «Особенности строения и свойств различных биорегуляторов и структурных биополимеров...» (пункт 7), «..разработку препаративных методов получения природных веществ и их химических модификаций в непосредственной связи с биологической функцией этих соединений,...» (пункт 12).

Объектом исследования диссертации является синтетический человеческий EGF, его мутантные формы (синтетический EGF D46G и рекомбинантный Met-EGF D46G) и их комплексы с рецептором, предметом

исследования – аминокислотные последовательности, пространственная структура EGF и его мутантной формы, межмолекулярные взаимодействия в комплексах EGF – EGFR, биохимическая активность EGF.

Актуальность темы диссертации

Рецептор эпидермального фактора роста представляет собой мембранный рецептор, обладающий внутренней тирозинкиназной активностью, функция которого заключается в регуляции развития эпителиальных тканей и поддержании их гомеостаза. В связи с его важнейшей физиологической функцией EGFR является мишенью для разработки противоопухолевых препаратов. Получение новых соединений, направленных на подавление aberrантной активности EGFR, является актуальной задачей. В настоящее время в качестве терапевтических агентов в основном рассматриваются ингибиторы тирозинкиназной активности. Потенциальными антагонистами EGFR могут быть лиганды, которые эффективно конкурируют с нативным EGF и другими пептидами семейства EGF-подобных факторов роста за связывание с рецептором. До настоящего времени полноразмерные мутантные формы EGF, способные блокировать активацию EGFR, в качестве самостоятельных агентов для противоопухолевой терапии не рассматривались. Также не рассматривались многие вопросы, касающиеся структуры фактора роста, в частности, вопрос существования димеров EGF, деталей взаимодействия EGF – рецептор.

Цель диссертационной работы – разработать мутантную форму человеческого EGF с аминокислотной заменой, снижающей его агонистическую активность, проанализировать его структуру, представляется актуальной и своевременной. Определение пространственной структуры и биологической активности мутантной формы EGF, полученной с помощью используемой автором системы бесклеточного синтеза белка, сравнение мутантной формы с синтетическими пептидами EGF и EGF D46G, позволит прояснить перспективы данного метода как альтернативного способа синтеза EGF-подобных факторов роста.

Следует отметить, что рекомбинантный фактор роста эпидермальный человеческий – высокоочищенный пептид, состоящий из 53 аминокислот, стимулирует пролиферацию фибробластов, кератиноцитов, эндотелиальных и других клеток, участвующих в ранозаживлении, и используется для эпителизации, рубцевания и восстановления эластичности тканей.

Все вышеперечисленное определяет актуальность диссертации Акуневич Анастасии Александровны.

Диссертация соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности в Республике Беларусь на 2021–2025 гг. (п. 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства»), утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156. Исследование выполнено в рамках грантов БРФФИ (номера государственной регистрации 20201208,

20213474) и НИР кафедры общей химии УО «БГМУ» (№ гос. регистрации 20210135).

Отдельный интерес представляет Аналитический обзор литературы, рассматривающий структуру и функции EGF и его рецептора, в том числе рецептор EGF как мишень для разработки противоопухолевых препаратов.

Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, которые выносятся на защиту

Соискатель на основании анализа имеющихся современных литературных данных обосновал цель и задачи исследования, решение которых будет обладать научной новизной.

Работа Акунович А.А. построена по следующей логичной схеме: впервые на основе биоинформационного анализа предложена замена Asp 46 С-концевого фрагмента EGF на аминокислоту глицин, которая снижает его аффинность к III домену EGFR, далее с помощью системы бесклеточного синтеза белка получена рекомбинантная форма мутантного EGF, Met-EGF D46G (с N-концевым остатком Met), с использованием комплекса спектральных методов исследована структура синтетического EGF и его мутантной формы, рассмотрены процессы диссоциации димеров EGF и EGF D46G, оценено взаимодействие мутантных форм EGF с рецептором, выяснена роль дисульфидных связей в структурных перестройках молекулы пептида, на последнем этапе работы исследованы биохимические эффекты синтетического пептида и выявлена его канцеростатическая активность в культуре клеток и в эксперименте у животных - опухоленосителей. Автор предположил и доказал, что нарушение взаимодействия EGF только с одним из доменов EGFR способствует снижению агонистической активности пептида и появлению у него свойств антагониста.

В работе впервые получен рекомбинантный Met-EGF D46G, структура и свойства которого автор сравнил с синтетическими EGF и EGF D46G. Автором впервые установлено, что синтетический EGF в водном растворе при pH 7,4 существует преимущественно в димерной форме и при температуре 35 °C – 40 °C претерпевает структурный переход. Показано, что разбавление раствора и повышение температуры до 50 °C способствует диссоциации его димеров. Автор установил структурные элементы сигнального пептида, определяющие его физико-химические свойства, взаимодействие с рецептором, биохимическую активность. Впервые установлено, что механизм связывания EGF с рецептором включает частичную потерю вторичной структуры лиганда, тогда как диссоциация его димеров происходит при контакте с внеклеточными доменами рецептора.

Показано, что замена аспарагиновой кислоты на глицин (D46G) в С-концевом фрагменте EGF, предложенная автором по результатам биоинформационного анализа, вызывает перестройку структуры пептида и повышение устойчивости димеров EGF D46G к нагреванию и разбавлению раствора, а также к повышению ригидности полипептидной цепи. Автор

установил, что восстановление дисульфидных связей в пептидах EGF и EGF D46G приводит к увеличению в них доли β -структуры и существенно уменьшает способность димеров синтетического EGF к диссоциации. Синтетический EGF D46G также не вызывает токсических эффектов у мышей линии Af и является частичным агонистом EGFR, т.к. в меньшей степени по сравнению с EGF стимулирует пролиферацию клеток эпидермоидной карциномы человека в бессывороточной среде, а при однократном подкожном введении EGF D46G тормозит формирование солидных опухолей у мышей. Значимым представляется доказательство того, что полученный с помощью системы бесклеточного синтеза белка эпидермальный фактор роста с заменой D46G (Met-EGF D46G) существует в растворе в виде димеров, имеет вторичную структуру, аналогичную таковой для синтетического EGF D46G, стимулирует пролиферацию клеток эпидермоидной карциномы человека в меньшей степени, чем синтетический EGF.

Представленные результаты и сформулированные на их основе выводы обладают несомненной научной новизной.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность и достоверность выводов, заключений и рекомендаций определяется:

1. Современной методологической базой исследований, включающей:
 - биоинформационные методы исследования, с помощью которых проанализировано влияние отдельных аминокислотных замен на стабильность элементов вторичной структуры активных форм EGF, моделирование пространственной структуры факторов роста EGF и EGF D46G;
 - синтез мутантной формы EGF с помощью системы бесклеточного синтеза белка;
 - комплекс биохимических и биофизических методов оценки структуры EGF, его мутантной формы и их взаимодействия с рецептором: аффинная хроматография с использованием рекомбинантных антигенов, нативный электрофорез в полиакриламидном геле, ультрафильтрация, спектральные методы исследования (инфракрасная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, флуоресцентная спектроскопия);
 - оценку активности исследуемых пептидов в отношении роста и пролиферации клеток HEp2C и моделирование солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у лабораторных животных.
2. Использованием необходимых контролей и достаточным количеством исследований в каждой группе.
3. Выбором методов статистической обработки полученных количественных данных.

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

Следующие результаты диссертации определяют научную значимость исследования:

Показано, что синтетический EGF в водном растворе существует преимущественно в димерной форме, в которой область контакта двух молекул формируется за счет С-концевых β -шпилек, а разбавление раствора и повышение температуры до 50 °С способствует их диссоциации.

Предложена замена D46G (аспарагиновая кислота – глицин) в С-концевом фрагменте EGF, которая вызывает перестройку межмолекулярной β -структуры, что приводит к переходу короткой С-концевой α -спирали в межмолекулярный β -лист, к повышению устойчивости димеров EGF D46G.

Продемонстрировано, что полное восстановление дисульфидных связей в синтетических EGF и EGF D46G приводит к увеличению в них доли β -структуры и снижает способность димеров синтетического EGF к диссоциации.

Установлено, что синтетический EGF D46G не вызывает токсических эффектов у мышей линии Af, является частичным агонистом EGFR и тормозит формирование солидных опухолей у мышей линии C57BL/6.

Полученный автором с помощью системы бесклеточного синтеза белка Met-EGF D46G существует в растворе в виде димеров, структурно аналогичен синтетическому EGF D46G, стимулирует пролиферацию клеток эпидермоидной карциномы человека в меньшей степени, чем синтетический EGF.

Теоретическая значимость работы определяется полученными фундаментальными представлениями о структуре эпидермального фактора роста, роли отдельных аминокислот в поддержании структуры, параметрах взаимодействия EGF с рецептором, возможности использования мутантных форм EGF как агонистов EGFR.

Практическая значимость работы определяется:

1. Разработкой метода получения мутантной формы EGF с помощью системы бесклеточного синтеза белка, который рекомендован в качестве альтернативного способа синтеза данного пептида, а также доказательством целесообразности доставки гена мутантного EGF в опухолевые клетки с помощью вектора для генной терапии. Мутантная форма EGF, полученная в настоящей работе, может быть использована для разработки новых соединений, направленных на подавление активности EGFR в опухолевых клетках.

2. Внедренными предложениями для использования результатов диссертации в учебном и научном процессе: Синтетический EGF D46G рекомендован для научных исследований в ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» (акт о внедрении от 20.09.2021), практические результаты

используются в учебном процессе кафедры общей химии УО «БГМУ» (акты о внедрении от 02.11.2020, 28.09.2021, 11.10.2022).

Экономическая и социальная значимость работы вытекает из вклада соискателя в решение проблемы конструирования рекомбинантных форм EGF и других факторов роста, биологически активных пептидов, вклада в решение проблемы разработки современных эффективных методов лечения онкологических заболеваний, а также в совершенствование учебного процесса с учетом обнаруженных автором структурных характеристик фактора роста и его взаимодействия с рецептором (в рамках дисциплин «Биохимия», «Биоорганическая химия», «Физиология»).

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Опубликование результатов диссертационной работы Акунович А.А. в научных изданиях соответствует требованиям ВАК к опубликованию результатов диссертации. По материалам диссертации опубликованы 18 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных изданиях, соответствующих п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (в том числе 5 статей на английском языке), 1 статья в отечественном научном журнале (0,37 авт. л.), 5 статей в сборниках научных статей и материалов конференций (1,16 авт. л.), 6 тезисов докладов (0,59 авт. л.). Общий объем опубликованных статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий, составляет 5,69 авт. л.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертация и автореферат диссертации Акунович Анастасии Александровны оформлены согласно действующей Инструкции о порядке оформления диссертации, диссертации в виде научного доклада, автореферата диссертации и публикаций по теме диссертации. Диссертация содержит новые научные результаты и сформулированные положения, выдвигаемые автором для публичной защиты. Работа имеет внутреннее единство. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), трех глав с анализом результатов собственных исследований (главы 3–5), заключения, списка использованных источников (включающего библиографический список и список публикаций соискателя) и 5 приложений. Полный объем диссертации составляет 168 страниц, из которых 100 страниц занимает машинописный текст. Работа включает 25 рисунков, 8 таблиц, 5 приложений. Список использованных источников, содержащий 240 источников (включая 18 работ соискателя), составляет 22 страницы. Автореферат и публикации по теме диссертации полностью соответствуют содержанию диссертации.

В тоже время анализ диссертации и автореферата выявил ряд вопросов и замечаний:

1. Оценивал ли автор способность EGF и его мутантных форм проникать сквозь мембранные барьеры, иммуногенность? С чем связана столь малая растворимость EGF и его мутантных форм в фосфатном буферном растворе с pH 7,4?

2. Насколько значимо для структуры и функции рекомбинантного Met-EGF D46G наличие концевой остатка метионина?

3. По какой причине в эксперименте по моделированию солидной опухоли у мышей описано влияние только однократной инъекции EGF и EGF D46G? Исследовалось ли влияние повторного введения EGF D46G мышам-опухоленосителям, в том числе в других дозах?

4. Какие еще сайты в структуре мутантного EGF могут быть рассмотрены для дополнительных аминокислотных замен с целью усиления его антагонистических свойств?

5. Чем автор объяснит факт того, что на спектрах флуоресценции на рис. 4.8 и 4.9, стр. 95–96 диссертации представлены два отдельных максимума, положение которых остается стабильным по мере нагревания?

Замечания и вопросы не влияют на высокую оценку диссертационной работы.

Диссертация Акуневич Анастасии Александровны «Получение, структурная характеристика и оценка биологической активности эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой» соответствует требованиям, предъявляемым ВАК Беларуси к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Анализ цели и задач работы, методологии исследования, научных результатов, теоретической и практической значимости, оформления диссертации, умения автора интерпретировать и интегрировать полученные результаты, свидетельствует о соответствии научной квалификации Акуневич Анастасии Александровны искомой степени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Акуневич Анастасии Александровны «Получение, структурная характеристика и оценка биологической активности эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой» является завершенным научным исследованием, содержащим новые данные о методах синтеза, структуре и возможности клинического использования эпидермального фактора роста с аминокислотной заменой.

Ученая степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия Акуневич Анастасии Александровны в соответствии требованиями Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, может быть присуждена за:

- проведение биоинформационного анализа аминокислотной последовательности эпидермального фактора роста человека, оценку стабильности элементов вторичной структуры, на основании которых предложена аминокислотная замена D46G, приводящая к снижению агонистической активности EGF;

- доказательство возможности получения мутантной формы EGF (рекомбинантного Met-EGF D46G) с помощью системы бесклеточного синтеза белка, который существует в растворе преимущественно в виде димеров, аналогичен синтетическому EGF D46G по вторичной структуре и биологическим свойствам, а именно ингибирует пролиферацию клеток эпидермоидной карциномы человека;

- установление способности синтетического EGF D46G эффективно конкурировать с другими пептидами семейства EGF-подобных факторов роста за связывание с EGFR, отсутствия у EGF D46G токсических эффектов при введении его мышам линии Af, способности ингибировать пролиферацию опухолевых клеток и тормозить формирование солидных опухолей у мышей линии C57BL/6;

- установление роли замены D46G в мутантной форме EGF, которая приводит к увеличению содержания β -структуры в составе EGF, вызывает удлинение и перестройку межмолекулярной β -структуры, увеличивает ригидность полипептидной цепи, снижает агонистическую активность EGF, что можно объяснить образованием нарушенного комплекса лиганда с рецептором;

- доказательство роли дисульфидных связей в молекуле EGF и его мутантной формы, восстановление которых приводит к увеличению количества аминокислотных остатков в β -структуре, реорганизации межмолекулярных контактов в димере и снижению способности димеров нативного EGF к диссоциации.

Официальный оппонент
профессор кафедры биохимии
Гродненского государственного университета
имени Янки Купалы,
д.б.н., профессор

И.Б. Заводник

И.Б. Заводник

23 июня 2025 г.

