

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 1 марта 2018 г. № 4 о присуждении
Нефёдовой Виктории Викторовне, гражданство Российская Федерация, учёной степени
кандидата биологических наук

Диссертация «Влияние аминокислотных замен в кристаллиновом домене, коррелирующих с развитием периферических невропатий, на структуру и свойства малого белка теплового шока HspB1» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 28 декабря 2017 г. (протокол № 15) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утверждён Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учётом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013г. № 74/нк и от 10.02.2014г. № 55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015г. № 1166/нк.

Соискатель Нефёдова Виктория Викторовна (1991 года рождения) в июне 2013 г. окончила с красным дипломом Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедру биохимии по специальности «Биохимия», и в октябре 2013 г. поступила в очную аспирантуру на этой кафедре.

Диссертационную работу соискатель Нефёдова В.В. выполняла на кафедре биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель – **Гусев Николай Борисович**, доктор биологических наук, член-корр. РАН, заведующий кафедрой биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Официальные оппоненты:

Ширинский Владимир Павлович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ;

Чеботарева Наталья Александровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук (ИБ РАН) в своем положительном заключении, подписанном заведующим отделом клеточной биологии, заместителем директора ИБ РАН Мининым А.А. и утвержденном директором ИБ РАН Колбом В.А., указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор Нефёдова В.В. заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что доктор биологических наук, профессор Ширинский Владимир Павлович является крупным специалистом в области исследования молекулярных механизмов клеточной подвижности и функционирования цитоскелета, а доктор биологических наук Чеботарева Наталья Александровна является признанным специалистом в области белкового крудинга и белков-шаперонов (в частности, малых белков теплового шока). Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в высоко цитируемых российских и международных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в группе

клеточной подвижности отдела клеточной биологии Института белка РАН на протяжении многих лет изучают промежуточные филаменты, а также изменения, происходящие в промежуточных филаментах при различных патологиях. Сотрудники этой группы являются высококвалифицированными специалистами в данной области исследований, напрямую связанной с тематикой диссертационной работы. Высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, публикации в которых удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Дацкевич П.Н., **Нефёдова В.В.**, Судницына М.В., Гусев Н.Б. (2012) Мутации малых белков теплового шока и наследственные заболевания человека. *Биохимия* 77(13): 1500-1514.
2. **Nefedova V.V.**, Datskevich P.N., Sudnitsyna M.V., Strelkov S.V., Gusev N.B. (2013) Physico-chemical properties of R140G and K141Q mutants of human small heat shock protein HspB1 associated with hereditary peripheral neuropathies. *Biochimie* 95 (8):1582-1592.
3. **Nefedova V.V.**, Sudnitsyna M.V., Strelkov S.V., Gusev N.B. (2013) Structure and properties of G84R and L99M mutants of human small heat shock protein HspB1 correlating with motor neuropathy. *Arch. Biochem. Biophys.* 538(1):16-24.
4. **Нефёдова В.В.**, Муранова Л.К., Судницына М.В., Рыжавская А.С., Гусев Н.Б. (2015) Малые белки теплового шока и дистальные наследственные невропатии. *Биохимия* 80(13): 1734-1747.
5. **Nefedova V.V.**, Sudnitsyna M.V., Gusev N.B. (2017) Interaction of small heat shock proteins with light component of neurofilaments (NFL). *Cell Stress Chaperones* 22(4): 467-479.

Результаты работы также были представлены на 5 отечественных и 2 международных конференциях:

В публикациях отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Ширинского В.П. (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

Основные замечания и вопросы по сути работы В.В. Нефёдовой следующие.

- При клонировании HspB1 и его мутантов в pET21a и pET23b векторы без специальных приемов на С-конце белка остается поли-Про или поли-Гис последовательность. Из текста диссертации и из статей автора не ясно, имелись ли такие последовательности в экспрессированных белках и, если имелись, какое влияние они могли оказать на формирование олигомеров HspB1.
- При анализе олигомеризации HspB1 дикого типа и HspB1 R140G в клетках HEK293F в связи с малым выходом мутантного белка проводили концентрирование белков из лизата осаждением ТХУ. По данным автора, это не повлияло на результаты хроматографии и распределение олигомерных форм HspB1 дикого типа. Насколько это справедливо для HspB1 R140G, агрегаты и олигомеры которого имеют более низкую стабильность?
- При выполнении экспериментов по химической сшивке HspB1 и HspB6 (Рис. 22) в последнем была сделана замена E116C для реализации сшивки. Насколько такая замена могла изменить структуру ACD и повлиять на формирование гетеродимеров малых белков теплового шока ?
- На рис. 33А HspB6 также эффективно, как и HspB8, разрушает пучки NFL филаментов, в то же время из рис. 33Г следует, что HspB6 практически не связывается с NFL. Объясняется ли это противоречие различным молярным соотношением NFL/HspB6 в обоих случаях или чем-то иным?
- По оформлению диссертационной работы В.В. Нефёдовой имеются следующие замечания. В тексте встречаются опечатки, например, на стр. 5, 10, 46, 53, 54, 57, 109 и др. На стр. 97 указан рис. 26Б б вместо рис. 27Б б. Для всех методов кроме Western Blotting автор нашел русскоязычный эквивалент. Адекватной заменой использованному английскому термину является иммуноблоттинг.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Чеботаревой Н.А. (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- Автор уделяет большое внимание структуре и шапероноподобной активности sHsps, но, к сожалению, в обзоре совсем не рассматривает влияние краудинга, который всегда

присутствует в клетках всех организмов, на олигомерное состояние и анти-агрегационную активность sHsps. Литературы на эту тему немного, но она есть, и ее стоило бы рассмотреть.

- Стр. 51 – при получении дифференциального распределения по коэффициентам седиментации $s(s)$ использовали плотность и вязкость воды (1.0 и 1,01002) при 20 °C, а надо использовать значения плотности и вязкости буферных растворов и присутствующей соли, так как это сказывается на результате фитинга.
- Стр. 76 – Таблица 7. Диаметр для частиц HspB1 и его мутантных форм приводится со стандартными отклонениями, а коэффициенты седиментации приведены без стандартного отклонения. Поскольку распределения по коэффициентам седиментации для HspB1 и его мутантных форм – широкие, желательно было бы указать стандартные отклонения.
- Стр. 104, раздел 3.7 – перепутана нумерация рисунка, приводится ссылка на рисунок 31Б, а нужно 32Б.
- В порядке дискуссии не соглашусь с утверждением автора, сделанном на основании седиментационного анализа (стр.104, рис. 31А). Автор диссертации считает, что при низкой ионной силе нет взаимодействия между тетрамерами NFL и HspB1, мотивируя это тем, что нет дополнительного пика на распределении $s(s)$ для смеси белков. Думаю, что не стоит это утверждать столь категорично, так как мы видим на распределении $s(s)$ для смеси смещение пика 1 (соответствующего NFL) в сторону меньших значений коэффициента седиментации и возрастание площади под пиком, а пик 2 (соответствующий HspB1) становится меньше и уже. В данном случае можно предположить, что диссоциированные формы HspB1 взаимодействуют с тетрамерами NFL. Конечно, это предположение нуждается в проверке.

Отзыв ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук (положительный).

Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- Анализ возможного участия HspB1 в регуляции цитоскелета представляется вполне оправданным, потому что часть работы посвящена возможному участию этого белка в сборке промежуточных филаментов. В тоже время описание возможного участия HspB1 в процессах апоптоза представляется малооправданным. В любом случае, если автор хотел остановиться на процессах апоптоза и возможного участия

HspB1 в этот процесс, было бы крайне желательным не ограничиваться словесным описанием этих сложных процессов, а привести хотя бы сильно упрощенную схему.

- К сожалению, в отличие от всех остальных рисунков, на рис. 16 не указано ни количество экспериментов, ни разброс получаемых величин.
- В тоже время остается не очень понятным, почему белок дикого типа (а также мутантная форма с заменой K141Q) способны образовывать гетероолигомерные комплексы двух типов со столь различными молекулярными массами. Отличаются ли эти комплексы по размеру и при этом стехиометрия HspB1/HspB6 в этих комплексах остается неизменной?
- К сожалению, в работе не представлены данные, касающиеся фосфорилирования мутантных форм R140G и K141Q. Было бы интересным исследовать влияние указанных мутаций на эффективность фосфорилирования и на стабильность гомоологомерных комплексов до и после фосфорилирования.
- Установлено, что при высокой концентрации HspB1 уменьшает количество нейрофиламентов в осадке, полученном как при низко-, так и при высокоскоростном центрифугировании. Любопытно, что аналогичным эффектом обладали и анализируемые мутантные формы HspB1, при этом количество мутантных форм, со-осаждающихся с нейрофиламентами, было несколько больше, чем количество HspB1 дикого типа, выявляемое в осадке филаментов. Возникает вопрос: насколько достоверен этот эффект и можно ли дать ему какое-то объяснение?

На автореферат поступили положительные отзывы от:

- ведущего научного сотрудника Отдела клеточных культур, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, доктора биологических наук **Хайтлиной Софьи Юрьевны**

В отзыве приведено следующее замечание:

«У меня есть замечание технического характера, оно касается названия диссертации и не носит принципиального характера. Мне кажется, что название «Влияние аминокислотных замен в кристаллиновом домене малого белка теплового шока HspB1, коррелирующих с развитием периферических невропатий, на структуру и свойства этого белка» было бы более понятным для читателя».

- заведующего лабораторией генной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», доктора биологических наук **Лазарева Василия Николаевича**, замечаний нет;

- заведующего лабораторией молекулярных основ клеточной подвижности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, доктора биологических наук, профессора **Боровикова Юрия Сергеевича**, замечаний нет;

- главного научного сотрудника Института Биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук **Пермякова Евгения Анатольевича**

В отзыве приведено следующее замечание:

«Следует отметить небольшую неточность в интерпретации диссертантом экспериментальных данных по триптофановой флуоресценции мутантных белков. Уменьшение интенсивности (квантового выхода) флуоресценции мутантных белков по сравнению с интенсивностью флуоресценции белка дикого типа вовсе не говорит об экспонировании остатков триптофана растворителю, поскольку этот параметр флуоресценции зависит от конкретного локального окружения хромофора в белке. Тушение флуоресценции может произойти и без выхода хромофора в водное окружение. В этом случае более информативным параметром является положение максимума спектра флуоресценции: при экспонировании триптофанового хромофора растворителю, происходит, как правило, сдвиг максимума спектра в длинноволновую область».

- заведующего кафедрой биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» кандидата биологических наук **Стефанова Василия Евгеньевича**

В отзыве приведены следующие вопросы и замечания:

1. Насколько физиологичны условия и можно ли полагать, что дисульфидные связи не оказывают влияния на процесс олигомеризации HSPB1 *in vivo*?
2. Могут ли описанные Вами мутантные формы HSPB1 иметь изменённую способность к образованию межмолекулярных дисульфидных связей в олигомерах? Возможен ли своего рода протективный эффект таких мутаций при оксидативном стрессе?

3. В работе мутантные формы HSPB1 сравниваются с эталонным WT (wild type) - рекомбинантным белком, полученным в прокариотическом продуценте и, вероятно, отличающемся от нативного HSPB1 человека. На это может указывать то, что белок от прокариотического продуцента элюируется с колонки в виде мономера, соответствующего олигомерной форме HSPB1 (Рис. 3, WT), а белок от эукариотического продуцента в виде двух пиков, соответствующих олигомерной и мономерной формам HSPB1 (Рис. 4, WT). Это отличие можно объяснить фосфорилированием HSPB1 или образованием комплексов с другими белками. В таком случае появляется вопрос, соответствуют ли активность и прочие свойства HSPB1 WT от прокариотического продуцента свойствам HSPB1, выделенного из тканей человека?

- ведущего научного сотрудника Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ, кандидата биологических наук

Воротникова Александра Вячеславовича, замечаний нет.

В дискуссии приняли участие:

д.б.н. Левицкий Д.И.

д.б.н. Шишкин С.С.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

- Замена аргинина R140, расположенного в $\beta 7$ -складке α -кристаллинового домена HspB1 на глицин, приводит к уменьшению собственной триптофановой флуоресценции белка и уменьшению его гидрофобности, снижает термостабильность и устойчивость белка к трипсинолизу. Помимо этого, аминокислотная замена R140G сопровождается значительным снижением шапероноподобной активности HspB1. Олигомеры HspB1 с заменой R140G нестабильны в условиях *in vitro* и *in vivo*. Указанные изменения структуры могут быть следствием того, что замена R140G сопровождается разрушением солевого мостика, стабилизирующего контакт между мономерами в составе димера HspB1.

- Аминокислотные замены G84R и L99M влияют на стабильность олигомеров HspB1, способствуя диссоциации, индуцированной фосфорилированием под действием MARKAP киназы 2.
- Малый белок теплового шока HspB1 и его исследуемые мутантные формы взаимодействуют с белком легкой цепи нейрофиламентов NFL и препятствуют его полимеризации. α B-кристаллин (HspB5) также взаимодействует с белком легкой цепи нейрофиламентов и ингибирует его полимеризацию. Другие малые белки теплового шока (HspB6 и HspB8) менее эффективны в регуляции полимеризации белка легкой цепи нейрофиламентов.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

В ходе исследования проведен детальный анализ физико-химических свойств четырех мутантных форм HspB1 (с заменами G84R, L99M, R140G и K141Q), экспрессия которых коррелирует с развитием невропатий периферической нервной системы. Получены новые данные о влиянии указанных аминокислотных замен в HspB1 на структуру и свойства этого белка. Установлено, что замена консервативного остатка R140, расположенного в β 7-складке, в области контакта мономеров в составе димера HspB1, оказывает наибольшее влияние на структуру и уменьшает шапероноподобную активность белка. Замены G84R и L99M, расположенные на границе N-концевого и кристаллинового доменов и в начале α -кристаллинового домена, дестабилизируют олигомерную структуру HspB1 и способствуют диссоциации, индуцированной фосфорилированием. Впервые показана возможность взаимодействия малого белка теплового шока HspB1 с белком легкой цепи нейрофиламентов NFL.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

В работе исследовано влияние четырех точечных аминокислотных замен в малом белке теплового шока HspB1, коррелирующих с возникновением дистальной врожденной моторной невропатии и/или невропатии Шарко-Мари-Тута 2 типа, на структуру и свойства белка. Высказано предположение, что измененная четвертичная структура и пониженная шапероноподобная активность могут быть причиной нарушения функционирования HspB1.

Показано, что мутантный белок с заменой R140G в β 7-складке α -кристаллинового домена способен образовывать комплексы с белком HspB1 дикого типа, и, вероятно,

может мешать нормальному функционированию последнего в клетках. Малый белок теплового шока HspB1 взаимодействует с белком легкой цепи нейрофиламентов NFL и ингибирует полимеризацию нейрофиламентов, образованных NFL. Автором получена клеточная линия HEK293F, стабильно синтезирующая мутантную форму HspB1 с заменой R140G, которая может быть использована в качестве модели для изучения влияния роли данной замены на функционирования белка в клетках.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчёты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Диссертация Нефёдовой В.В. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого арсенала современных методов, взаимосвязанностью выводов и результатов, а также публикациями в рецензируемых журналах (5 статей).

На заседании 1 марта 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Нефёдовой Виктории Викторовне учёную степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 12 докторов биологических наук, 5 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

«За» присуждение ученой степени – 18,

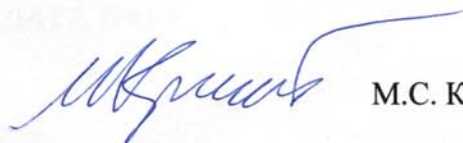
«Против» – нет,

Недействительных бюллетеней – нет.

Заместитель председателя диссертационного

совета ФИЦ биотехнологии РАН

доктор биологических наук, профессор



М.С. Крицкий

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский



«2» марта 2018 г.