

ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ НЕФЁДОВОЙ В.В.

«Влияние аминокислотных замен в кристаллиновом домене, коррелирующих с развитием периферических невропатий, на структуру и свойства малого белка теплового шока HSPB1», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Малые белки теплового шока (sHsp) играют важную роль в регуляции гомеостаза клетки. Нарушения в их структуре вследствие мутаций в их генах зачастую приводят к развитию различных заболеваний. Так ряд аминокислотных замен в кристаллиновом домене белка HSPB1, отвечающем за олигомеризацию HSPB1, ассоциирован с развитием прогрессирующего повреждения аксонов моторных и/или сенсорных нейронов, что приводит к развитию дистальной врожденной моторной невропатии и болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа. Несмотря на связь мутаций в гене HSPB1 с этими заболеваниями, точный механизм развития патологии неясен. В широком смысле его изучению и посвящена данная работа, что подтверждает актуальность выбранной темы.

Для исследования влияния аминокислотных замен на свойства HSPB1 автором хроматографически очищены рекомбинантные HSPB1 дикого типа и его мутантные формы в прокариотическом продуценте на основе *E. coli*. Получены также HSPB1 в продуценте на основе линии HEK293, но в этом случае анализировали клеточный лизат. В обоих случаях с помощью гель-проникающей хроматографии автором определены размеры и количество образуемых HSPB1 олигомеров. Владея в совершенстве необходимым арсеналом методов, Н.В.Нефёдова убедительно продемонстрировала различия в структуре и свойствах HSPB1 дикого типа и его мутантных форм. Она показала, что последние характеризуются меньшей термостабильностью и шапероноподобной активностью, дестабилизацией межсубъединичных контактов.

В частности, с помощью ограниченного протеолиза выявлен факт экспонирования N-конца мутантной молекулы в раствор. Была установлена меньшая склонность к олигомеризации фосфорилированных форм мутантных белков, чем нативных. Несомненный интерес представляет описание анализа модели структуры димера α -кристаллиновых доменов HspB1, построенной на основе кристаллографических данных PDB: 3Q9Q и 2WJ7) для объяснения взаимодействия определенных аминокислотных остатков, ответственных за изменения способности HspB1 к олигомеризации. Наконец, диссертант доказал способность HSPB1 ингибировать полимеризацию лёгкой цепи нейрофиламентов NFL, что как раз предлагает непосредственный механизм влияния

изменений в свойствах мутантных форм HSPB1 на функции нейронов, что подчеркивает значение полученного результата.

Следует особо отметить, что автору удалось в серии экспериментов выделить влияние именно электростатических взаимодействий на структуру и активность HSPB1, методически корректно отделяя его от вклада, в частности, дисульфидного обмена. Однако *in vivo*, на активность белка могут влиять и другие факторы, перекрывая вклад электростатических взаимодействий, например в эксперименте с шапероноподобной активностью HSPB1 по отношению к лизоциму и субфрагменту-1 миозина. В обоих случаях показана разница в шапероноподобной активности мутантных форм HSPB1 и белка дикого типа. Однако, в случае с лизоцимом, HSPB1 скорее стимулировал, чем предотвращал его агрегацию, что, вероятно, обусловлено тем, что для денатурации лизоцима был использован восстановитель. Таким образом, могло происходить образование дисульфидных связей между молекулами лизоцима и HSPB1. Поскольку в работе как раз исключается влияние подобных факторов, возможно, было бы лучше подвергнуть и этот объект денатурации повышением температуры или изменением pH в пределах, допустимых для HSPB1.

В работе все изучаемые образцы HSPB1 от прокариотических продуцентов содержат дитиотреитол, так что остатки цистеина в HSPB1 находятся в восстановленной форме. Эксперимент по сравнению способности к олигомеризации HSPB1 WT и HSPB1 R140G от эукариотического продуцента также проведён в присутствии восстановителя – бета-меркаптоэтанола. Таким образом, исключается влияние образования межмолекулярных дисульфидных связей на процесс олигомеризации HSPB1. В связи с этим возникает несколько вопросов: 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 окислительном стрессе?

В работе мутантные формы HSPB1 сравниваются с эталонной WT (wild type) -. рекомбинантным белком, полученным в прокариотическом продуценте и, вероятно, отличным 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?

Возникающие вопросы и комментарии ни в коей мере не умаляют значимости полученных результатов и высочайшего методического уровня работы, а, напротив, указывают на большой к ней интерес. Полученные автором данные о механизмах позволяют глубже понять механизм работы HSPB1, а демонстрация автором способности HSPB1 влиять на сборку промежуточных филаментов вносит вклад в понимание развития патологий нервной системы, связанных с дисфункцией HSPB1.

Диссертационное исследование, несомненно, актуально, оно содержит результаты, отличающиеся новизной, теоретическим и практическим значением, и вполне обоснованные выводы. Судя по автореферату, диссертационная работа Нефёдовой В.В. «Влияние аминокислотных замен в кристаллиновом домене, коррелирующих с развитием периферических невропатий, на структуру и свойства малого белка теплового шока HSPB1» является оригинальным, законченным и ценным научным трудом, соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, выдвигаемым "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. №748), а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Октябрь 09.02.2018
Стефанов Василий Евгеньевич,

кандидат биологических наук по специальности 03.01.04 биохимия, доцент,
заведующий кафедрой биохимии биологического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»,

199034 Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Телефоны: +7 (921) 553-90-76, +7 (812) 328-21-82

e-mail: stefanov@spbu.ru

Личную подпись В.В. Стефанова заверяю
Документ подготовлен по личной инициативе
Текст документа размещён в открытом доступе на
сайте СПбГУ по адресу <http://spbu.ru/science/expert.html>
Ведущий специалист по кадрам

З.Р.Дмитриенко

14.02.2018