

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Виктории Викторовны Нефедовой «Влияние аминокислотных замен в кристаллиновом домене, коррелирующих с развитием периферических невропатий, на структуру и свойства малого белка теплового шока HspB1», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Актуальность.

Белки теплового шока, в том числе, т.н. малые белки теплового шока составляют обширную часть протеома человека и животных. Известно, что эти белки принимают непосредственное участие в формировании собственно протеома, регулируя правильную сборку вновь синтезируемых белковых молекул, формирование белковых комплексов и стабилизацию структуры белков в стрессовых ситуациях, в частности, при тепловом шоке, а также при других экстремальных воздействиях. Помимо шаперонной функции, обеспечивающей белковый гомеостаз клетки, белки теплового шока участвуют в регуляции ряда физиологических процессов, например, сократимости кардиомиоцитов, воздействуя на фосфорилирование фосфоламбана (HspB6), аутофагии, клеточной дифференцировки и др. В малых белках теплового шока семейства HspB выявлен ряд мутаций, ассоциированных с периферическими невропатиями. Так, в HspB1 человека мутации распределены практически по всей длине аминокислотной последовательности белка и ассоциированы с такими патологиями, как болезнь Шарко-Мари-Тута, дистальная врожденная моторная невропатия, боковой амиотрофический склероз. Изучение роли этих мутаций в развитии болезни позволяет создать предпосылки для разработки в будущем адекватных методов лечения, например, на основе редактирования генома или других еще не отработанных сегодня молекулярно-генетических подходов. Не менее важно для развития науки и накопление фундаментальных знаний о молекулярных механизмах функционирования шаперонов. В этой связи работа В.В. Нефедовой является несомненно актуальной.

Разумеется, в одной диссертационной работе невозможно исследовать все мутации HspB1, и автор сосредоточился на четырех ранее не исследованных мутациях, три из которых расположены в границах альфа-кристаллинового домена (L99M, R140G, K141Q) и одна в непосредственной близости от него в N-концевом домене белка (G84R). Известно, что кристаллиновый домен важен для димеризации HspB1 – первичного молекулярного события при образовании олигомеров HspB1 более высокого порядка. Распределение перечисленных мутаций в области кристаллинового домена предполагает

существенные структурно-функциональные отличия мутантов от HspB1 дикого типа. Именно на поиск и выявление таких различий и была нацелена работа В.В. Нефедовой.

В задачи исследования входило:

1. проанализировать влияние точечных аминокислотных замен, соответствующих изучаемым мутациям, на физико-химические свойства HspB1 и его шаперонную активность *in vitro* и в культивируемых клетках;
2. изучить способность HspB1 и его мутантов образовывать олигомерные комплексы, в том числе, с другим малым белком теплового шока HspB6;
3. исследовать взаимодействие HspB1 и его мутантных форм с белком легкой цепи нейрофиламентов.

Методы.

Все варианты HspB1 и другие использованные в работе белки автор получил методами молекулярного клонирования и экспрессии в бактериальной системе. Затем белки были очищены до 90-95% чистоты с помощью классических биохимических методов (высаливание, хроматографии, электрофорез, концентрирование). Дополнительно, с помощью лентивирусной трансдукции и последующей селекции на антибиотике были получены эукариотические клетки HEK293F, стабильно экспрессирующие HspB1 и его мутантную форму HspB1 R140G.

Для решения поставленных задач автор использовал широкий спектр биохимических и физико-химических методов исследования, а именно, анализ собственной флуоресценции белка и флуоресценции меток (bis-ANS, пирен), метод динамического светорассеяния, метод аналитического ультрацентрифугирования и другие виды седиментации белков, химическое сшивание белков, гель-фильтрацию и ионообменную хроматографию, электрофорез белков в различных системах, иммуноблоттинг, автордиографию, электронную микроскопию и ряд других подходов.

Методическое оснащение диссертационной работы впечатляет и одновременно убеждает в том, что результаты, полученные с помощью такого арсенала современных научных подходов, являются достоверными.

Результаты работы.

В работе получены новые интересные фундаментальные результаты, основными из которых можно назвать следующие.

1. Оказалось, что изученные мутантные формы HspB1 в различной степени влияют на ряд параметров этого белка, таких как формируемая им самим четвертичная структура и ее стабильность в условиях фосфорилирования HspB1 протеинкиназой MAPKAPK2, повышения температуры или изменения концентрации HspB1. Изменяется устойчивость к протеолизу и собственная триптофановая флуоресценция белка, что также свидетельствует о структурных различиях мутантов от белка дикого типа. Большинство мутантов HspB1 формировало крупные, но очень нестабильные олигомеры *in vitro*. По совокупности параметров наиболее дестабилизирующей оказалась замена R140G. Это интересный факт, учитывая, что расположенная рядом замена K141Q была значительно более доброкачественной. При пространственном моделировании этих замен в кристаллиновом домене стало ясно, что R140 обеспечивает более критическую электростатическую связь в области контакта двух антипараллельных доменов, чем K141, который расположен латеральнее, повернут в другую сторону и, вероятно, не несет такой стабилизационной нагрузки, как R140. Эти данные автора позволили ранжировать изучаемые мутации в HspB1 по степени их воздействия на структуру белка.

2. Несмотря на замены все исследованные варианты HspB1 были способны образовывать гетероолигомерные комплексы с HspB6, но они всегда были меньше гетероолигомеров HspB6 и HspB1 дикого типа. По оценке молекулярных масс это были тетрамеры и димеры. Эти данные позволяли предположить, что шаперонная активность мутантов HspB1 будет отличаться от активности белка дикого типа.

3. Однако при экспериментальном анализе шапероноподобной активности мутантов HspB1 все оказалось не так однозначно. Хотя HspB1 R140G и в этом тесте выглядел наиболее слабым шапероном, другие мутанты HspB1 были сравнимы либо с ним, либо с HspB1 дикого типа. Это зависело от того, какой белок использовали в качестве модельного субстрата. В случае, когда в качестве субстрата взяли экстракт клеток HEK293F, шаперонная активность HspB1 R140G оказалась не хуже таковой для HspB1 дикого типа.

4. Наконец, автор продемонстрировал, что мутантные формы HspB1 прочнее связываются с белком легкой цепи нейрофиламентов *in vitro*. При этом они ингибировали полимеризацию нейрофиламентов в той же степени, что и HspB1 дикого типа. Дополнительно, диссертант исследовал и другие белки семейства HspB и показал, что HspB5, HspB6 и HspB8 в разной степени способны ингибировать полимеризацию нейрофиламентов.

Полученные автором результаты существенно углубляют знания о механизмах действия малых белков теплового шока, главным образом, HspB1. Из спектра изученных мутаций HspB1 наиболее выраженное действие оказывала мутация R140G, которая, вероятно, может вносить больший вклад в развитие наследственных периферических невропатий, чем другие мутации. Роль этой мутации, несомненно, нуждается в дальнейшем изучении с помощью адекватных животных моделей, что выходит далеко за пределы данной работы. Благодаря усилиям автора появились новые экспериментальные данные о роли белков семейства HspB в динамике нейрофиламентов. Это позволяет более полно представлять процессы с участием HspB в нервной системе, в том числе в условиях патологии. Созданные диссертантом культуры клеток НЕК293F, экспрессирующие мутантные формы HspB1, являются удобным инструментом для дальнейшего анализа влияния мутаций в этом шапероне на различные аспекты биологии клетки. Кстати, было бы интересно оценить шаперонную активность мутантов HspB1 непосредственно в этих клетках, т.е. сначала подвергнуть их тепловому или иному шоку, а затем проанализировать в их экстрактах количество растворимого белка. В целом, полученные В.В. Нефедовой результаты имеют важное фундаментальное значение и могут в будущем найти практическое применение.

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

1. 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.

2. При анализе олигомеризации HspB1 дикого типа и HspB R140G в клетках НЕК293F 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?

3. 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 гетеродимера HspB?

4. 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?

Структура и оформление работы.

Диссертационная работа В.В. Нефедовой изложена на 134 страницах и написана по традиционному плану. Она включает введение, обзор литературы, раздел материалы и методы, раздел результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы и список литературы (180 источников). Работа снабжена 34 рисунками и 8 таблицами.

Обзор литературы написан достаточно компактно (30 стр.) живым языком и иллюстрирован шестью рисунками и схемами, помогающими читателю лучше понять суть проблемы и направление работы автора. Этот раздел работы демонстрирует, что диссертант хорошо владеет литературным материалом в своей области и в смежных областях. В целом, обзор литературы успешно выполняет роль подготовки читателя к восприятию экспериментальной части работы.

Раздел Материалы и Методы отличается обстоятельностью в изложении использованных подходов. Приведенные в нем протоколы очень подробные и снимают многие (но не все, см. выше) вопросы, возникающие при ознакомлении с экспериментальной частью работы. Очень полезны в это разделе схемы проведения экспериментов, они всегда легче воспринимаются, чем монотонный текст.

Раздел собственных исследований занимает основную часть диссертации и показывает, какую объемную работу провел автор при исследовании белков семейства HspB. Этот раздел содержит большое количество первичных данных (хроматограмм, электрофореграмм и результатов иммуноблоттинга, спектров поглощения и флуоресценции). Их качество свидетельствует о тщательности работы автора и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов. Также в этом разделе приведен ряд схем, графически обобщающих полученные данные.

Обсуждение результатов также компактно, как и обзор литературы. При этом все существенные находки автора подробно обсуждены, сопоставлены с данными литературы и корректно интерпретированы.

По результатам работы сформулировано 4 вывода. Они адекватно отражают суть полученных автором результатов.

По оформлению диссертационной работы В.В. Нефедовой имеются следующие замечания. В тексте встречаются опечатки, например, на стр. 5, 53, 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.

Замечания по сути и оформлению диссертационной работы не являются принципиальными и не снижают ценности полученных автором данных. Результаты работы были представлены автором на российских и международных конференциях и опубликованы в 5 статьях в рейтинговых российских и международных журналах. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

Таким образом, диссертационная работа В.В. Нефедовой «Влияние аминокислотных замен в кристаллиновом домене, коррелирующих с развитием периферических невропатий, на структуру и свойства малого белка теплового шока HSPB1», несомненно, является законченной высококачественной научно-квалификационной работой, выполненной непосредственно диссертантом и полностью соответствующей требованиям Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

И.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности
главный научный сотрудник
Института экспериментальной кардиологии
Национального медицинского исследовательского
центра кардиологии Минздрава России
доктор биологических наук
(14.00.06 - кардиология, 03.00.04 – биохимия)
профессор

Владимир Павлович Ширинский
Адрес: ФГБУ НМИЦ кардиологии МЗ РФ,
ул. 3-я Черепковская, д. 15а, Москва 121552, Россия
E-mail: shirinsky@gmail.com; тел.: 8-495-414-7246



В.П. Ширинский

Подпись д.б.н., проф. В.П. Ширинского
Ученый секретарь НМИЦ кардиологии МЗ РФ
доктор медицинских наук



А.А. Скворцов

12.02.2018