

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Нефёдовой Виктории Викторовны
на тему: «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»

Представленная диссертационная работа Виктории Викторовны Нефёдовой посвящена исследованию влияния аминокислотных замен в кристаллиновом домене, коррелирующих с развитием периферических невропатий, на структуру и функции малого белка теплового шока HspB1. Семейство малых белков теплового шока (sHsps) принадлежит классу молекулярных шаперонов. Малые белки теплового шока обладают уникальной динамичной четвертичной структурой, которая может меняться при изменении окружающих условий. Олигомерное состояние большинства sHsp в клетке в условиях стресса может меняться при связывании белками-мишенями. Известно, что на четвертичную структуру влияют условия краудинга и целый ряд других факторов. На образование и стабильность олигомеров могут влиять мутации, различные посттрансляционные модификации белка, а также взаимодействие с другими белками. Такая динамичная четвертичная структура sHsps необходима для их функционирования и проявления шапероноподобной (анти-агрегационной) активности. sHsps предотвращают агрегацию развернутых белков путем их связывания. Малые белки теплового шока принимают участие в поддержании клеточного гомеостаза и регуляции таких важных процессов, как апоптоз, реорганизация сократительного аппарата и цитоскелета и пролиферация. Точечная мутация в генах sHsps может приводить к утрате их способности поддерживать гомеостаз и вызывать различные

нейродегенеративные заболевания. На сегодняшний день установлена связь sHsp со многими заболеваниями, такими как различные виды миопатий и невропатий, онкологические заболевания, болезни Альцгеймера, Паркинсона и другие. Представителей семейства sHsps объединяет наличие высоко консервативного α -кристаллинового домена в центральной части молекулы, который фланкирован вариабельным и, как правило, неупорядоченным N-концевым доменом и коротким C-концевым доменом. Мутации, коррелирующие с периферическими невропатиями, могут быть в любом из трёх доменов. В связи с этим не вызывает сомнений актуальность исследования влияния точечных аминокислотных замен в кристаллиновом домене на структуру и свойства малого белка теплового шока HspB1. Детальное исследование таких процессов на молекулярном уровне имеет важное фундаментальное значение. Кроме того, работа имеет практическое значение, так как автором получена клеточная линия HEK293F, стабильно синтезирующая мутантную форму HspB1 с заменой R140G, которая может быть использована при исследованиях в других лабораториях. Новые данные, полученные в настоящей работе, используются в лекциях на Биологическом факультете МГУ.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения полученных результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа содержит 134 страницы машинописного текста, 8 таблиц и 34 рисунка. Список литературы включает 180 отечественных и зарубежных источников.

В разделе «Введение» автор кратко обосновывает актуальность и значимость проведения исследований, явившихся предметом представленной работы. Автор описывает цель данной работы – анализ структуры и свойств мутантных форм малого белка теплового шока HspB1 с аминокислотными заменами G84R, L99M, R140G и K141Q, экспрессия которых коррелирует с

развитием наследственных нейродегенеративных заболеваний, и очерчивает круг задач, выполнение которых было необходимо для достижения цели.

В обзоре литературы представлены данные о структуре и функциях малых белков теплового шока. Особое внимание уделено описанию мутантных форм малого белка теплового шока HspB1. Обзор литературы состоит из 6 разделов. В первых двух разделах рассматривается белковый гомеостаз в клетке и роль малых белков теплового шока (sHsps) в его поддержании. Подробно рассмотрена структура малых белков теплового шока человека, а также их способность образовывать динамичные высокомолекулярные комплексы, состоящие как из гомоолигомеров, так и из гетероолигомеров. Хотя в настоящее время из-за сложной динамичной четвертичной структуры нет атомной модели крупных олигомеров, образуемых HspB1 и α -кристаллинами (HspB4 и HspB5), но предложены псевдоатомные модели четвертичной структуры α B-кристаллина. Виктория Викторовна подробно рассматривает 2 модели: модель Джейле и соавт., которая основана на данных, полученных методами твердофазного ядерно-магнитного резонанса (ssNMR), малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) и электронной микроскопии с негативным контрастированием, и модель Браун и соавт., которая была получена комбинацией методов крио-электронной микроскопии и твердофазного ядерно-магнитного резонанса. Обе модели предполагают, что сферические олигомеры α B-кристаллина собраны из гексамеров («тример димеров»). В тоже время, имеются значительные различия, главным образом затрагивающие структуру и положение N-концевого домена α B-кристаллина.

Раздел 3 посвящен шапероноподобной активности sHsps, под которой подразумевается способность sHsps связывать развернутый белок и удерживать его от дальнейшей агрегации. Рассматриваются разные аспекты олигомеризации и диссоциации sHsps, влияние фосфорилирования на

четвертичную структуру HspB1, а также взаимосвязь четвертичной структуры и шапероноподобной активности sHsp. Важность регуляции олигомерного состояния sHsps на сегодняшний день не вызывает сомнения, однако нет единого мнения о том, какая из олигомерных форм sHsp (крупные или мелкие олигомеры) функционально активна.

Раздел 4 посвящен структуре и функциям HspB1. В этом разделе подробно рассмотрена регуляция олигомерной структуры HspB1 путем фосфорилирования, в результате которого происходит диссоциация высокомолекулярных олигомеров до димеров и тетрамеров. В ответ на воздействие стресса или добавление веществ, индуцирующих апоптоз, в клетках линии HeLa наблюдается увеличение степени фосфорилирования и вызванная этим диссоциация крупных олигомеров HspB1. Высказывается предположение, что, S-тиолирование может также являться одним из дополнительных механизмов регуляции олигомерного состояния HspB1.

Раздел 5. рассматривает взаимосвязь известных мутаций в HspB1 и наследственных нейродегенеративных заболеваний. На сегодняшний день известно более 20 мутаций в гене малого белка теплового шока человека HspB1, наличие которых коррелирует с возникновением дистальной врожденной моторной невропатии и болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа – заболеваний, характеризующихся прогрессирующим повреждением аксонов моторных и/или сенсорных нейронов. Исследования по влиянию аминокислотных замен, коррелирующих с развитием невропатий, на структуру и функции HspB1 ведутся довольно давно, тем не менее, многие вопросы остаются нерешенными и остается непонятным, каким образом точечные замены в HspB1 приводят к развитию невропатий.

Раздел 6 описывает структуру промежуточных филаментов. Нарушения в нормальном распределении нейрофиламентов в нейронах

считается причиной возникновения и развития многих заболеваний нервной системы (невропатий). Предполагается, что аминокислотные замены в HspB1, коррелирующие с развитием невропатий, могут влиять на его взаимодействие с основным компонентом промежуточных филаментов нейронов – легкой цепью нейрофиламентов.

В целом, обзор литературы производит очень хорошее впечатление. Он написан хорошим языком, содержит ссылки, как на ранние работы, так и на публикации последних лет, читается с большим интересом. Обзор дает довольно полное представление о современном состоянии исследований в данной области. Обзор наглядно свидетельствует о том, что диссертант прекрасно ориентируется в современной литературе по рассматриваемым вопросам.

Хотя есть замечание по обзору. 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.

Раздел «Материалы и методы» содержит достаточно полное изложение использованных методик, которые могут быть воспроизведены по приведенным описаниям. В диссертационной работе Нефёдовой В.В. применялся разносторонний подход к изучаемым проблемам и был использован широкий арсенал современных методов. Подробно описаны методы получения рекомбинантного HspB1 дикого типа (WT) и его мутантных форм, а также получение белка легкой цепи нейрофиламентов. Автор использовал различные биохимические и биофизические методы исследования, например, такие как, метод ограниченного протеолиза, аналитическое ультрацентрифугирование, гель-фильтрация, динамическое

светорассеяние, метод трансмиссионной электронной микроскопии, иммуноблоттинг, электрофорез, флуоресцентная спектроскопия и спектрофотометрия. Такое сочетание и применение разнообразных методов позволили диссертанту успешно решить поставленные задачи.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из 3 разделов. В 1 разделе автор подробно описывает получение рекомбинантного HspB1 и его мутантных форм. По данным электрофореза чистота полученных препаратов белка была не менее 95%. В разделе 2 автор подробно анализирует влияние точечных замен на структуру и физико-химические свойства HspB1 и его мутантных форм. Рассматривается влияние точечных мутаций и на взаимодействие HspB1 с другими малыми белками теплового шока. В разделе 3 автор анализирует взаимодействие HspB1 и других малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов (NFL). Каждый раздел полученных результатов обоснован, наглядно представлен, анализ новых данных проведен в свете ранее известного материала о структуре HspB1 и других точечных замен в кристаллиновом домене. Обращает на себя внимание большое количество и наглядность иллюстраций.

Хочу выделить основные результаты диссертации, отличающиеся **научной новизной:**

Было установлено, что точечные замены в α -кристаллиновом домене могут сопровождаться изменениями структуры HspB1, приводящими к уменьшению термостабильности, дестабилизации межсубъединичных контактов и уменьшению шапероноподобной активности.

Точечные мутации G84R и L99M индуцируют изменения четвертичной структуры. По данным гель-фильтрации и аналитического ультрацентрифугирования ансамбли гомоолигомеров мутантов больше по размерам по сравнению с ансамблями гомоолигомеров HspB1 дикого типа.

Показано, что точечная замена R140G приводит к значительному, а замены G84R и L99M к незначительному уменьшению шапероноподобной активности HspB1, измеренной *in vitro*.

Показано, что мутантная форма HspB1 R140G образует гетероолигомеры с белком дикого типа.

Проверено предположение о том, что малые белки теплового шока, которые экспрессируются в нервной ткани HspB1, HspB5, HspB6 и HspB8, влияют на сборку промежуточных филаментов, образуемых белком легкой цепи нейрофиламентов (NFL). Установлено, что HspB1 и его исследуемые мутантные формы, а также HspB5 ингибируют процесс полимеризации NFL. Два других малых белка теплового шока, HspB6 и HspB8, менее эффективны в регуляции полимеризации NFL.

Прочтение данной работы оставляет в целом благоприятное впечатление, однако она не свободна от некоторых недостатков. В частности, можно отметить следующие небольшие замечания:

Стр. 51- при получении дифференциального распределения по коэффициентам седиментации $s(s)$ использовали плотность и вязкость воды (1.0 и 0,01002) 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 частиц для HspB1 и его мутантных форм приводится со стандартным отклонением, 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 $c(s)$ для смеси белков. Думаю, что не стоит это утверждать столь категорично, так как мы видим на распределении $c(s)$ 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. Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

По теме диссертации было опубликовано 10 работ, среди которых 5 статей в рецензируемых журналах и 5 тезисов. Работа представляет собой хорошо спланированное и тщательно выполненное многоплановое научно-квалификационное исследование. Работа выполнена на хорошем экспериментальном уровне, актуальность и научная новизна очевидны, а достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, все они подтверждены экспериментальными данными. Представленный автореферат диссертации по содержанию полностью соответствует диссертации.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Виктории Викторовны Нефёдовой «Влияние аминокислотных замен в кристаллиновом домене, коррелирующих с развитием периферических невропатий, на структуру и свойства малого белка теплового шока HspB1» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует критериям, изложенным в п. 9 «Положения ВАК РФ о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от

24.09.2013г. № 842 (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 года № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а ее автор, Нефёдова Виктория Викторовна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
Ведущий научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка
Федеральное государственное учреждение
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук

Чеботарева Наталья Александровна

14.02.2018

Тел.: 8(495) 952-25-47; e-mail: chebotareva@inbi.ras.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.04 - Биохимия

Адрес: 119071, Москва, Ленинский проспект д.33, строение 2
Федеральное государственное учреждение
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук
Тел.: 8(495)-954-4007, e-mail: orlovsky@inbi.ras.ru

Подпись сотрудника, д.б.н. Чеботаревой Н.А.
Удостоверяю
Ученый секретарь
ФИЦ Биотехнологии РАН

e-mail: orlovsky@inbi.ras.ru
Тел.: (495)-954-4007



к.б.н. Орловский А.Ф.