

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской
академии наук (ИБ РАН)

142290 г. Пущино, Московская обл.,

ул. Институтская, д. 4,

Тел./факс +7(495)514-02-18;

факс +7(4967)318-435

E-mail: protres@vega.protres.ru

ОКПО 02699748, ОГРН 1025007773262,

ИНН/КПП 5039001220/503901001

№ 115/03-15

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
бюджетного учреждения
науки Института белка РАН,
доктор биологических наук

В.А. Колб



19 февраля 2018 года

На № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации 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 кандидат биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Для нормального функционирования различных типов клеток в них поддерживается определенный белковый состав. Это достигается постоянным синтезом новых белковых молекул и удалением поврежденных. Процессы синтеза белка de novo и его правильного сворачивания (фолдинга), а также удаление «устаревших» молекул белка находится под жестким контролем многочисленных внутриклеточных систем. Разнообразные белки теплового шока образуют одну из таких контрольных систем, обеспечивающую нормальный метаболизм (протеостаз) белков в клетке. Среди белков теплового шока выделяют несколько семейств, отличающихся по своему размеру, внутриклеточной локализации, зависимости активности от АТФ, а также уровню и условиям экспрессии. Различные классы белков теплового шока способны предотвращать агрегацию частично денатурированных белков, обеспечивать их частичную или полную ренатурацию, а также доставлять денатурированные и не способные к ренатурации белки, к местам их протеолитической деградации. Очевидно, что любые повреждения белков теплового шока приводят к тем или иным повреждениям системы протеостаза и, как следствие этого, к различным патологическим процессам. По этой причине представляется важным исследовать структуру и свойства мутированных белков теплового шока, экспрессия которых коррелирует с развитием различных патологий. Поэтому актуальность диссертационной работы В.В.Нефедовой, посвященной анализу структуру и свойств нескольких мутантных форм одного из малых белков теплового шока, HspB1, не вызывает сомнения.

Диссертационная работа В.В. Нефедовой построена по традиционному плану и состоит из краткого введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, изложения полученных результатов, их обсуждения, заключения и списка литературы, в котором цитируется 178 источников.

Обзор литературы включает в себя 6 глав. В первой вводной главе автор описывает систему белков теплового шока и дает краткую характеристику белкам семейств Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60 и Hsp40. В этой же вводной главе приводится классификация малых белков теплового шока, являющихся объектом исследования, и приводятся общие сведения об этом классе белков.

Вторая глава посвящена особенностям первичной структуры различных представителей семейства малых белков теплового шока. Подробно разбирается структура кристаллинового домена и приводятся данные, свидетельствующие о том, что этот домен играет ключевую роль во взаимодействии мономеров малых белков теплового шока и в образовании стабильных димеров, являющихся строительными блоками крупных олигомеров. Хорошо описана роль С-концевого домена и консервативного трипептида IPI(V), вовлеченного во взаимодействие димеров малых белков теплового шока. Как нам кажется, менее удачно описана структура N-концевого домена малых белков теплового шока. Например, говорится, что консервативный WDPF играет важную роль в стабилизации крупных олигомеров малых белков теплового шока (стр. 16). В тоже время из данных рис.1 следует, что этот мотив так сказать в первоизданном виде обнаруживается только в структуре HspB1 и в какой-то степени в структуре HspB8 (который не образует крупных олигомеров). Возможно, этот мотив играет какую-то роль в стабилизации крупных олигомеров HspB1, но, вероятно, не стоит приписывать ему столь важную роль для всех малых белков теплового шока.

Третья глава обзора литературы целиком посвящена описанию шаперонно-подобной активности малых белков теплового шока. В ней подробно анализируется влияние малых белков теплового шока на аморфную агрегацию различных белков-субстратов и приводятся данные о том, что разные участки малых белков теплового шока участвуют в предотвращении аморфной и амилоидной агрегации модельных белков и пептидов-субстратов.

Большая четвертая глава обзора литературы посвящена подробному описанию структуры и свойств одного из малых белков теплового шока, HspB1, являющегося основным объектом исследования диссертанта. Сначала автор подробно описывает четвертичную структуру HspB1 и перечисляет способы регуляции олигомерного состояния этого белка. Затем она останавливается на способности HspB1 образовывать гетеро-олигомерные комплексы с другими малыми белками теплового шока и переходит к описанию различных физиологически важных функций этого белка. Представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что HspB1 участвует в регуляции большого количества различных внутриклеточных процессов. Из этих процессов В.В. Нефедова выбирает два – участие HspB1 в регуляции различных элементов цитоскелета и участие HspB1 в процессах апоптоза. 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 этом процессе, было бы крайне желательным не ограничиваться словесным описанием этих сложных процессов, а привести хотя бы сильно упрощенную схему.

Пятая глава обзора литературы посвящена анализу возможной связи между мутациями малого белка теплового шока HspB1 и врожденными заболеваниями человека. Автор подробно описывает различные формы невропатий и характеризует белки, мутации которых могут быть каким-то образом связаны с проявлением симптомов периферической наследственной невропатии. Завершается этот раздел описанием мутантных форм HspB1, синтез которых в той или иной степени коррелирует с периферическими невропатиями. При этом автор описывает около 30 мутантных форм HspB1, накопление которых в клетке коррелирует с развитием различных форм периферических невропатий. Этот раздел диссертации производит очень хорошее впечатление и свидетельствует о том, что автор свободно ориентируется в большом массиве данных литературы. Заключительный подраздел этой главы касается описания возможных молекулярных механизмов возникновения периферических невропатий. В.В. Нефедова перечисляет различные белки, повреждения которых могут сопровождаться развитием симптомов наследственных нейродегенеративных заболеваний. Из приведенных данных следует, что одной из причин возникновения периферических невропатий может быть нарушение различных элементов цитоскелета. Известно, что малые белки теплового шока участвуют в регуляции и стабилизации цитоскелета. Поэтому логичным представляется анализ взаимодействия малых белков теплового шока дикого типа и их мутантных форм с белками цитоскелета.

Заключительная глава обзора литературы посвящена описанию структуры и свойств белков нейрофиламентов, промежуточных филаментов нейронов. Сначала автор описывает основные особенности строения белков промежуточных филаментов и анализирует процессы их полимеризации. Затем приводится краткая характеристика белков нейрофиламентов и обсуждаются данные литературы о механизмах регуляции их сборки и разборки. В.В. Нефедова приводит примеры, когда различные виды патологий являются следствием как мутаций в структуре белков промежуточных филаментов, так и белков, участвующих в регуляции их сборки и разборки. Отсюда логично следует предположение о том, что мутации малых белков теплового шока могут тем или иным образом влиять на формирование промежуточных филаментов нейронов. В целом обзор литературы производит очень хорошее впечатление. Автор свободно владеет данными литературы и умело обсуждает их. Несмотря на некоторую многословность, читатель, ознакомившийся с обзором литературы, получает всю информацию, необходимую для понимания основной части диссертационной работы.

Раздел «Материалы и методы» изложен на 34 страницах машинописного текста и содержит описание молекулярно-биологических, биохимических и биофизических методов, использованных в работе. В.В. Нефедова подробно описывает процедуры, использовавшиеся для получения мутантов гена HspB1, экспрессии и методах выделения этого белка и его точечных мутантных форм. Детально описаны спектральные методы

исследования анализируемых белков, а также методы аналитического ультрацентрифугирования и динамического светорассеивания. Несомненный интерес представляют данные о лентивирусной экспрессии HspB1 в клетках линии HEK293F. Отдельные разделы этой главы диссертационной работы посвящены подробному описанию метода выделения легкой цепи нейрофиламентов, а также изложению экспериментальных подходов, использованных для анализа взаимодействия различных малых белков теплового шока с легкой цепью нейрофиламентов. Этот раздел диссертационной работы (как, впрочем, и другие раздела работы) аккуратно оформлен и содержит всю необходимую информацию, позволяющую при желании воспроизвести те или иные экспериментальные подходы.

Изложение результатов диссертант начинает с экспрессии в бактериях и очистки рекомбинантных белков. В ходе выполнения этой части работы были получены гомогенные препараты HspB1 дикого типа и четырех его мутантных форм с точечными заменами в кристаллиновом домене. Далее В.В. Нефедова приступила к исследованию физико-химических свойств полученных белков. В ходе выполнения этой части исследования было показано, что точечная замена R140G сопровождается наиболее значительными изменениями структуры HspB1. Эта точечная замена приводит к изменению кинетики ограниченного трипсинолиза, изменению собственной триптофановой флуоресценции белка и уменьшению его термической стабильности. Остальные исследованные точечные мутации (G84R, L99M, R141Q) сопровождаются менее выраженными изменениями свойств HspB1, однако практически все исследованные мутантные формы обладают меньшей термической стабильностью, чем HspB1 дикого типа. Любопытные данные были получены при исследовании гидрофобных свойств анализируемых белков с использованием гидрофобного зонда бис-АНС. В этом случае, как и при ранее использованных экспериментальных подходах, было установлено, что точечная мутация R140G приводит к наибольшим изменениям структуры белка. К сожалению, в отличие от всех остальных рисунков, на рис.16 не указано ни количество экспериментов, ни разброс получаемых величин.

Следующий большой раздел диссертационной работы посвящен анализу четвертичной структуры HspB1 дикого типа и его мутантных форм с точечными заменами в кристаллиновом домене. С помощью методов гель-фильтрации, скоростного ультрацентрифугирования и динамического светорассеяния была исследована четвертичная структура HspB1 дикого типа и его мутантных форм. Было убедительно показано, что все точечные мутации (за исключением K141Q) существенно дестабилизируют четвертичную структуру белка. При этом при низкой концентрации олигомеры, образованные мутированными белками, нестабильны и склонны, в отличие от HspB1 к диссоциации. Наоборот, при высокой концентрации эти дестабилизи-рованные олигомеры мутантных белков склонны к ассоциации и образуют агрегаты, размеры которых существенно превосходят размеры олигомеров, образованных белком дикого типа. Логичным продолжением этих экспериментов стала та часть работы, в которой В.В. Нефедова пыталась сравнить олигомерное состояние HspB1 дикого типа и его точечной мутантной формы R140G, экспрессируемых в клетках HEK293F. Было установлено, что мутантная форма HspB1 преимущественно представлена в виде олигомеров малой молекулярной

массы, в то время как белок дикого типа представлен как крупными, так и сравнительно мелкими олигомерами. Трудно не согласиться с В.В. Нефедовой в том, что трудно дать однозначную интерпретацию этим очень интересным данным. Как бы то ни было, представленные результаты означают, что мутация R140G может сопровождаться существенными изменениям четвертичной структуры HspB1. Несомненный интерес представляют экспериментальные данные, согласно которым мутантная форма R140G может образовывать гетероолигомеры с белком дикого типа. Вероятно, образование таких гетероолигомеров может нарушать нормальное функционирование HspB1 и становится причиной того, что указанная точечная мутация носит доминантный характер.

Продолжая свое исследование, В.В. Нефедова обратилась к исследованию способности белка HspB1 и его мутантных форм взаимодействовать с другим малым белком теплового шока, а именно HspB6. В ходе этого исследования было установлено, что все анализируемые формы HspB1 способны взаимодействовать с HspB6 и при этом могут образовываться гетероолигомерные комплексы с кажущимися молекулярными массами ~100 и ~300 кДа (данные на рис. 21). Видно, что мутантные формы HspB1 менее эффективно взаимодействуют с HspB6, чем белок дикого типа и при этом преимущественно образуют гетероолигомерные комплексы с кажущейся молекулярной массой 100 кДа. Этот факт хорошо документирован и не вызывает сомнения. 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 стехиометрии входящих в них компонентов или они отличаются только по размеру и при этом стехиометрия HspB1/HspB6 в этих комплексах сохраняется неизменной?

Интересные результаты были получены при исследовании фосфорилирования HspB1 и его мутантных форм. Было установлено, что мутации G84R и L99M не влияют на скорость и эффективность фосфорилирования HspB1 под действием MAPKAP2 киназы. В тоже время указанные мутантные формы оказались более чувствительными к фосфорилированию, чем белок дикого типа и уже при очень низком уровне фосфорилирования практически полностью диссоциировали до малых олигомеров. 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 гомеолигомерных комплексов до и после фосфорилирования.

Измерение шапероноподобной активности на изолированных модельных белках-субстратах показало, что анализируемые мутантные формы HspB1, как правило, обладают пониженной шапероноподобной активностью. В тоже время опыты, проведенные на нефракционированном лизате клеток HEK293F, не выявили существенных различий в шапероноподобной активности белка дикого типа и его R140G и K141Q мутантных форм. Указанное кажущееся противоречие свидетельствует о сложности корректного измерения шапероноподобной активности малых белков теплового шока и о необходимости в будущем разработки новых методов для измерения такой активности.

Завершив анализ физико-химических свойств анализируемых белков, В.В. Нефедова приступила к исследованию влияния малых белков теплового шока на

процессы полимеризации легкой цепи нейрофиламентов. Был разработан метод экспрессии и модернизированная процедура выделения рекомбинантной легкой цепи нейрофиламентов из клеток *E.coli*. 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 HspB1, со-осаждающихся с нейрофиламентами, было несколько больше, чем количество HspB1 дикого типа, выявляемое в осадке нейрофиламентов (рис.27Д). Возникает вопрос, насколько достоверен этот эффект и можно ли дать ему какое-то объяснение? Используя метод со-осаждения, В.В.Нефедова определила стехиометрию связывания HspB1 дикого типа с белком легкой цепи нейрофиламентов, которая оказалось равной одному олигомеру HspB1 на 24 мономеров белка легкой цепи нейрофиламентов.

В своей работе В.В.Нефедова попыталась определить молекулярный механизм ингибирующего влияния HspB1 на полимеризацию нейрофиламентов. Для этого было проведено исследование влияния HspB1 на фосфорилирование белка легкой цепи нейрофиламентов, а также проведены опыты по ультрацентрифугированию смеси HspB1 и белка нейрофиламентов, находящегося в виде тетрамеров, а также филаментов, сформированных в присутствии HspB1 дикого типа. Полученные данные свидетельствуют о том, что HspB1 не взаимодействует с тетрамерами белка нейрофиламентов, но при этом, по всей видимости, способен взаимодействовать с ULF-частицами (Unit Length Filaments) и каким-то образом влияет на заключительные стадии полимеризации нейрофиламентов. К сожалению, В.В. Нефедовой удалось подобрать условия, при которых препараты легкой цепи нейрофиламентов быка образовывали только короткие филаменты, состоящие из нескольких ULF-частиц, а не протяженные филаменты толщиной 10 нм. Это дополнительно затруднило интерпретацию полученных результатов.

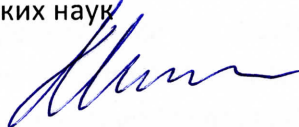
В заключительной части своего исследования В.В.Нефедова использовала метод флуоресцентной спектроскопии для исследования кинетики полимеризации легкой цепи нейрофиламентов. Она пометила единственную SH-группу белка нейрофиламентов пиренил-амалеимидом и анализировала процесс полимеризации нейрофиламентов по изменению интенсивности флуоресценции этой метки. Оказалось, что полимеризация белка нейрофиламентов, индуцированная повышением ионной силы, сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции мономера и уменьшением интенсивности флуоресценции эксимера пиренил-малеимида. Это позволяло следить в реальном времени за процессами полимеризации белка нейрофиламентов. Оказалось, что как HspB1 дикого типа, так и его анализируемые мутантные формы в одинаковой степени замедляют процесс полимеризации белка легкой цепи нейрофиламентов. В тоже время оказалось, что другие представители семейства малых белков теплового шока по-разному влияют на процесс полимеризации нейрофиламентов. АльфаВ-кристаллин (HspB5) столь же эффективно, как HspB1, ингибировал полимеризацию нейрофиламентов. В тоже время два других представителя класса малых белков теплового шока, HspB6 и HspB8, были заметно менее эффективны в регуляции процессов полимеризации нейрофиламентов.

В разделе «Обсуждение результатов» В.В. Нефедова тщательно и подробно обсуждает полученные результаты и грамотно сопоставляет их с данными литературы, демонстрируя отличную осведомленность в рассматриваемой проблеме. Заключение во многом повторяет обсуждение результатов.

Завершая анализ работы Виктории Викторовны Нефедовой, можно заключить, что эта диссертационная работа посвящена актуальной проблеме, выполнена на высоком научном уровне и содержит оригинальные научные данные, получившие свое отражение в публикациях, вышедших в свет как в отечественных, так и в международных научных журналах. Диссертационная работа Виктории Викторовны Нефедовой «Влияние аминокислотных замен в кристаллиновом домене, коррелирующих с развитием периферических невропатий, на структуру и свойства малого белка теплового шока HspB1» в полной мере 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.

Отзыв заслушан и обсужден на научном семинаре Отдела клеточной биологии и утвержден на заседании Ученого совета Института белка РАН.

Заведующий Отделом клеточной биологии,
заместитель директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института белка РАН,
кандидат биологических наук



Александр Александрович Минин

Адрес: 142290 г. Пущино, Московская обл.,
ул. Институтская, д. 4, Тел./факс +7(495)514-02-18
Электронная почта: alexminin@gmail.com

Подпись к.б.н. А. А. Минина заверяю

Ученый секретарь ИБ РАН,
кандидат биологических наук

Е. Ю. Никонова

« 9 » февраля 2018 года

