



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

ул. Вавилова д. 26, Москва, 119334
Тел.: (499) 135-33-22. Факс (499)135-80-12. E-mail: info@idbras.ru
ОКПО: 02699062 ОГРН 1027700450800 ИНН/КПП 7736044850/773601001
<http://idbras.ru>

«У Т В Е Р Ж Д А Ю»

И.о. Директора

Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова (ИБР РАН)
д.б.н.

На № 11.01.2024 № 12506/01-3
от _____



Н.П. Шарова

«11» января 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Шатова Владислава Михайловича**
«N-концевой домен малых белков теплового шока: участие в олигомеризации и белок-белковых взаимодействиях», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы

Белки теплового шока играют важную роль в поддержании белкового гомеостаза (протеостаза) в клетке, контролируя процесс правильного сворачивания белков и обеспечивая ренатурацию частично денатурированных белков, накапливающихся в ходе различных неблагоприятных условий. Белки теплового шока представлены в виде нескольких классов, различающихся по молекулярной массе мономеров, зависимости от АТФ и внутриклеточной локализации. Одним из классов белков теплового шока являются так называемые малые белки теплового шока (small heat shock proteins, sHsp), для которых характерен малый молекулярный вес мономеров, наличие в структуре высоко консервативного кристаллинового домена и независимость функционирования от концентрации АТФ. Геном человека содержит 10 генов, кодирующих малые белки теплового шока, которые в разных количествах экспрессируются в различных тканях и которые способны образовывать различные по форме и размеру гомо- и гетероолигомерные комплексы. Малые белки теплового шока участвуют в многочисленных внутриклеточных процессах, таких как предотвращение агрегации частично денатурированных белков, перенос денатурированных белков на АТФ-зависимые белки теплового шока, избирательная протеолитическая деградация частично денатурированных белков, регуляция апоптоза, регуляция окислительно-восстановительного состояния клетки, а также контроль за состоянием сократительного аппарата и цитоскелета клетки. В связи с тем, что

малые белки теплового шока участвуют в столь многочисленных и разнообразных процессах, оказалось, что мутации этих белков зачастую коррелируют с различными врожденными заболеваниями человека. Все это делает целесообразным и важным подробное изучение структуры и свойств всего семейства малых белков теплового шока. Поэтому актуальность работы В.М. Шатова, посвященной исследованию N-концевого домена нескольких представителей семейства малых белков теплового шока человека, не вызывает сомнения.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

В рамках работы впервые проведен систематический анализ свойств и олигомерного состояния кристаллиновых доменом пяти различных малых белков теплового шока человека. Получена большая коллекция мутантных форм различных малых белков теплового шока с заменами и делециями в N-концевом домене и исследована способность белков дикого типа и их мутантных форм образовывать гомо- и гетероолигомерные комплексы. Проведено подробное исследование физико-химических свойств двух мутантных форм HspB6, экспрессия которых может коррелировать с развитием кардиомиопатии. Разработан метод экспрессии и выделения рекомбинантного малого белка теплового шока человека HspB7 и исследованы некоторые его физико-химические свойства.

Структура диссертации

Диссертация оформлена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы, содержащего ссылки на 180 источников, и приложения. Работа изложена на 111 страницах, содержит 39 рисунков и 4 таблицы.

В работе поставлено шесть конкретных задач, на решение которых было направлено проведенное исследование. На основе выполнения этих задач было сформулировано шесть положений, выносимых на защиту. По результатам выполненной работы были сформулированы пять выводов, которые в полной мере отражают основное содержание работы. Выводы в полной мере опираются на полученные результаты, они достоверны и хорошо аргументированы.

Оценка содержания диссертационной работы, ее завершенность

Во **введении** автор обосновывает актуальность темы исследования, формулирует основные цели работы и задачи, решаемые в ходе выполнения работы, а также формулируются основные положения, выносимые на защиту. В этом разделе также приводятся сведения об апробации полученных результатов на конференциях и публикациях соискателя по теме диссертации.

Обзор литературы состоит из шести больших глав. В первой главе диссертант анализирует систему протеостаза и приводит современную классификацию белков теплового шока, обеспечивающих поддержание протеостаза. Вторая глава целиком посвящена описанию структуры мономеров малых белков теплового шока. Автор подробно характеризует α -кристаллиновый домен и обсуждает свойства и функции, приписываемое этому центральному

наиболее консервативному участку в первичной структуре малых белков теплового шока. Далее в этой же главе автор подробно характеризует сначала С-концевой, а затем и N-концевой домен мономеров малых белков теплового шока. Диссертант приводит данные литературы о том, что С-концевой домен содержит в своем составе консервативный трипептид I(V)-X-(I)V, который обладает высокой подвижностью и может взаимодействовать как с гидрофобной канавкой одного и того же мономера или образовывать «мостик» с соседним мономером и таким образом обеспечивать формирование малых олигомеров белков теплового шока. Особое внимание уделено характеристике N-концевого домена. Автор убедительно показывает, что этот недостаточно подробно изученный участок малых белков теплового шока может участвовать в многочисленных взаимодействиях и может быть вовлечен как во взаимодействии малых белков теплового шока белками-субстратами, так и в образовании крупных олигомерных комплексов малых белков теплового шока. Три следующих друг за другом главы обзора литературы касаются механизмов, лежащих в основе формирования крупных олигомеров малых белков теплового шока, роли N-концевого домена в формировании этих олигомеров и, наконец, способности малых белков теплового шока образовывать гетероолигомерные комплексы. Автор подробно цитирует литературу последних лет и поэтому у читателя формируется ясное представление о наиболее важных проблемах, остающихся нерешенными до последнего времени. В тоже время материалы, представленные в этих трех главах, тесно связаны между собой. Поэтому остается не совсем понятным, зачем следовало дробить повествование на три главы. Наконец, последняя глава обзора литературы посвящена описанию взаимодействия малых белков теплового шока с белками партнерами. Совершенно очевидно, что в силу выполняемых функций, малые белки теплового шока должны обладать способностью взаимодействовать с большим количеством разнообразных белков. Вполне оправданно, что из большого количества различных белков-партнеров диссертант выбрал два наиболее важных белков-адаптеров – Bag3 и 14-3-3. Как уже отмечалось, обзор литературы содержит богатую критически проанализированную информацию о структуре, свойствах и механизме функционирования малых белков теплового шока и хорошо подготавливает читателя к восприятию последующих разделов диссертации.

Глава «**Материалы и методы**» содержит достаточно подробное описание различных методов, использованных в работе. Автор приводит сведения о полученных им молекулярно-биологических конструкциях и о способах экспрессии и очистки рекомбинантных белков. Отдельный раздел посвящен описанию методов исследования структуры малых белков теплового шока, где описано измерение шапероноподобной активности, флуоресцентные методы исследования, а также фосфорилирование под действием сАМР-зависимой протеинкиназы. Большой раздел посвящен описанию методов, которые были использованы для анализа четвертичной структуры исследуемых белков. Автор успешно применил комбинацию методов гель-фильтрации электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия для исследования четвертичной структуры α -кристаллиновых доменов, а также гомо- и гетероолигомеров малых белков теплового шока. Помимо этого, для анализа

четвертичной структуры белков успешно применялся метод химического «сшивания», динамического светорассеяния и гель-фильтрации, сопряженной с многоугловым рассеянием света (MALS). Весь раздел изложен достаточно подробно и позволяет читателю при необходимости легко использовать перечисленные методы в своей работе.

Раздел «**Результаты исследования**» состоит из шести глав. Первая глава касается процедур, использованных для выделения исследуемых белков и пептидов. Как нам кажется, появление такой главы в начале описания полученных результатов выглядит не очень оправданным. Все методы выделения были в той или иной степени описаны в разделе «Материалы и методы» и кажется не понятным, зачем возвращаться к этой же проблеме в разделе «Результаты исследования». Подраздел, касающийся методов экспрессии и выделения HspB7, несомненно, представляет большой интерес. Разработка метода выделения этого рекомбинантного белка является важным и существенным достижением.

Вторая глава этого раздела касается характеристики кристаллиновых доменов малых белков теплового шока. В литературе долгое время было принято считать, что кристаллиновые домены являются наиболее консервативными участками малых белков теплового шока и поэтому обладают сходными или даже идентичными свойствами. В тщательно выполненных исследованиях В.М. Шатов показал, что такая точка зрения нуждается в пересмотре. Оказалось, что кристаллиновые домены HspB1, HspB5 и HspB6 действительно похожи и склонны образовывать устойчивые димеры, в то время как кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 не способны образовывать стабильные димеры и преимущественно представлены в виде мономеров. Диссертант предпринял попытку объяснить такие различия, проанализировав первичную структуру кристаллиновых доменов, и убедительно показал, что кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 содержат в своем составе точечные замены, которые предотвращают образование устойчивых солевых мостиков и водородных связей между мономерами и поэтому не способны образовывать стабильных димеров.

В третьей главе раздела «Результаты исследования» диссертант провел анализ способности изолированных кристаллиновых доменов встраиваться в структуру олигомеров полноразмерных белков. Оказалось, что олигомеры, образованные HspB1 и HspB5, обладают высокой стабильностью и поэтому встраивание собственных или чужеродных кристаллиновых доменов оказывается достаточно затруднительным. Было высказано предположение, что процесс встраивания кристаллиновых доменов затруднен тем, что N-концевые домены полноразмерных белков стабилизируют четвертичную структуру комплексов. Для того чтобы ослабить стабилизирующее влияние N-концевого домена на структуру олигомера HspB1 был использован мутантный белок, в котором были проведены точечные замены остатков серина на аспарагиновую кислоту, имитирующие фосфорилирование (так называемая 3D мутантная форма HspB1). Действительно оказалось, что в случае фосфоимитирующих замен в полноразмерном HspB1, кристаллиновые домены HspB1, HspB5 и HspB6 успешно встраиваются в крупные олигомеры HspB1. В этих же условиях кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 не способны встраиваться в крупные олигомеры малых белков теплового шока.

Четвертая глава раздела «Результаты исследования» посвящена анализу роли полуконсервативного sRLFDQxFG участка в N-концевом домене нескольких малых белков теплового шока. Оказалось, что замена консервативного остатка Arg на Ala зачастую приводит к результатам, сопоставим с фосфорилированием определенных участков в структуре N-концевого домена малых белков теплового шока. Таким образом, для некоторых малых белков теплового шока, склонных к образованию крупных олигомеров, введение отрицательного заряда (фосфорилирование или замена остатков серина на аспарагиновую кислоту) или замена положительного заряженного остатка аргинина на аланин приводит к дестабилизации четвертичной структуры и облегчает как встраивание изолированных кристаллиновых доменов, так и образование гетероолигомерных комплексов малых белков теплового шока.

Недавно опубликованные данные свидетельствуют о том, что точечные замены S10F и P20L в N-концевом домене HspB6 коррелируют с развитием некоторых форм кардиомиопатий. Молекулярные механизмы, которые могут лежать в основе этих корреляций, не были исследованы. По этой причине было целесообразно исследовать влияние указанных точечных замен на структуру и свойства HspB6. В ходе работы, выполненной В.М. Шатовым, было установлено, что указанные замены приводят к существенному увеличению гидрофобности HspB6, вследствие чего увеличивается вероятность агрегации этого белка. Помимо этого, указанные точечные замены приводят к изменению шапероноподобной активности, причем с некоторыми субстратами происходит существенное увеличение этой активности. Казалось бы, увеличение шапероноподобной активности должно усиливать защитный эффект HspB6. На самом деле увеличение гидрофобности может приводить к тому, что HspB6 оказывается способным не специфически взаимодействовать со многими другими белками, отличными от настоящих белков-субстратов. Вследствие этого может происходить нарушение большого количества различных процессов, следствием чего может стать развитие кардиомиопатии.

Заключительный раздел главы Результаты исследования, посвящен анализ особенностей структуры N-концевых доменов HspB7 и HspB8. Приступая к этому разделу, диссертант сначала разработал метод экспрессии и выделения рекомбинантного HspB7. Оказалось, что этот белок обладает целым рядом необычных свойств и в частности, имеет выраженную тенденцию к агрегации. Диссертант разработал эффективный метод выделения HspB7 дикого типа и сумел получить мутантную форму HspB7, лишенную либо всего N-концевого домена, либо уникальной полисериновой последовательности. Оказалось, что эти транскрибированные формы заметно менее склонны к агрегации, чем белок дикого типа. Эти результаты являются дополнительным свидетельством того, что N-концевой домен играет важную роль в формировании крупных олигомеров и, возможно, агрегатов малых белков теплового шока. Вторым объектом, исследованным в этом разделе, стал другой малый белок теплового шока HspB8. До последнего времени в литературе не было единого мнения о его олигомерной структуре. В ходе исследования, проведенного В.М. Шатовым, было установлено, что этот белок в основном представлен в виде мономеров, хотя при повышенной

концентрации становится возможным образование димеров. В серии дополнительных экспериментов было проанализировано взаимодействие HspB8 и его кристаллинового домена с универсальным адаптером Bag3 и установлено, что два этих белка способны образовывать прочные комплексы.

Диссертационная работа завершается кратким заключением, в котором суммированы все собранные результаты и проводится их обсуждение.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен в стандартной форме и в полной мере отражает основные результаты, выносимые на защиту. Автореферат дает полное представление об основных разделах диссертационной работы и о вкладе соискателя.

Апробация диссертации и вклад соискателя

Результаты работы отражены в 8 публикациях, вышедших в свет в отечественных и международных журналах, а также были доложены на заседаниях кафедры биохимии биологического факультета МГУ, межлабораторном семинаре ФИЦ Биотехнологии РАН, а также на межлабораторном семинаре sHSP WOG Meeting в 2019 г. (Лёвен, Бельгия) и на 46-м Международном Конгрессе FEBS в 2022 г. (Лиссабон, Португалия). Автор внес свой вклад на всех этапах выполнения работы, начиная от отработки используемых методик и завершая получением экспериментальных данных, их обработки, обсуждения результатов, подготовки статей и тезисов конференций.

Рекомендации по использованию научных выводов диссертационной работы

В ходе выполнения диссертационной работы был разработан оригинальный метод выделения рекомбинантного HspB7, одного из малых белков теплового шока, а также усовершенствованы ранее предложенные методы выделения других малых белков теплового шока (HspB1, HspB5, HspB6 и HspB8). Было проведено подробное изучение физико-химических свойств мутантных форм HspB6, экспрессия которых коррелирует с развитием кардиомиопатии. Это исследование может представлять определенный интерес при разработке методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Замечания и вопросы

1. Диссертационная работа аккуратно оформлена и содержит тщательно подготовленные рисунки, однако, к сожалению, соискатель не смог полностью избежать некоторых недочетов в стиле изложения и небольшого количества опечаток и неточностей.
2. Как уже отмечалось, в обзоре литературы некоторые главы неоправданно детализированы, что приводит к ненужным повторам.
3. Автор разработал оригинальный метод экспрессии и выделения HspB7. К сожалению, процедура экспрессии и выделения описаны в диссертации очень бегло и без деталей. Вероятно, следовало описать эту оригинальную методику более подробно и перенести это описание в главу, в которой рассматриваются свойства HspB7.

4. В работе было проведено исследовано взаимодействие Bag3 с HspB8 и его кристаллиновым доменом. Для более полного понимания участия малых белков теплового шока в процессах автофагии напрашивается проведение аналогичных экспериментов с другими малыми белками теплового шока и их кристаллиновыми доменами.

Перечисленные замечания вопросы не принципиальны и не умаляют больших достоинств рецензируемой работы

Заключение

Работа В.М. Шатова «N-концевой домен малых белков теплового шока: участие в олигомеризации и белок-белковых взаимодействиях», представляет собой целостное завершённое исследование, выполненное на высоком уровне. Эта работа полностью удовлетворяет требованиям установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденному Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 №335, от 02.06. 2016 №748, от 29.05.2017 №650, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Диссертационная работа В.М. Шатова «N-концевой домен малых белков теплового шока: участие в олигомеризации и белок-белковых взаимодействиях», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия заслушана, отзыв на нее подготовлен и утвержден на объединенном научном семинаре профильных лабораторий Института биологии развития им. Н.Е. Кольцова РАН (Протокол № 2 от 22 декабря 2023 года).

Отзыв на диссертационную работу В.М. Шатова подготовлен главным научным сотрудником, доктором биологических наук Павлом Владимировичем Авдониным.

АВДОНИН Павел Владимирович,
главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией физиологии
рецепторов и сигнальных систем ИБР РАН
профессор, доктор биологических наук
по специальности 1.5.4. Биохимия

Контактные данные:

тел.: +7 (499) 135-70-09, e-mail: pvavdonin@bk.ru

Адрес места работы: 119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 26

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,

Тел.: +7 (499) 135-33-22; e-mail: info@idbras.ru

«Подпись П.В. Авдонова заверяю»
Учёный секретарь ИБР РАН, к.б.н.

11 января 2024г



Хабарова М.Ю.