

## Отзыв на автореферат диссертационной работы

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

Диссертационная работа Шатова В. М. посвящена изучению механизмов функционирования малых белков теплового шока (small heat shock proteins, sHsp) человека, в частности, изучению процессов сборки олигомерных комплексов данных белков и определению роли в этих процессах N-концевых доменов sHsp.

sHsp - большая и гетерогенная группа белков, присутствующих у архей, бактерий, растений и практически во всех органах и тканях животных и играющих важную роль в различных метаболических процессах, направленных на поддержание клеточного гомеостаза и ликвидацию негативных последствий, индуцируемых в клетках в стрессовых условиях. sHsp участвуют в регуляции редокс-состояния клетки, активности ряда ферментов, функционирования цитоскелета, в процессах клеточной дифференциации (включая злокачественное перерождение), апоптоза и др.. В клетках, подвергающихся воздействию неблагоприятных факторов, sHsp выполняют функции молекулярных шаперонов и предотвращают накопление агрегатов неправильно свернутых или частично денатурированных белков, защищая клетки от повреждающего влияния и предотвращая их гибель. Нарушение функционирования sHsp приводит к развитию серьезных заболеваний, таких как катаракта, нейродегенеративные болезни, некоторые виды кардиомиопатий, и др. Информация о структуре и механизмах регуляции активности sHsp однозначно представляет интерес для практической медицины. Известно, что, как правило, sHsp присутствуют в клетках в виде сложных олигомеров и изменения, приводящие к изменению олигомерного состояния sHsp, могут приводить к изменению их шаперонной активности, однако к настоящему времени нет однозначных данных, касающихся механизмов образования гомо- и гетероолигомерных комплексов sHsp и роли отдельных доменов белков в этих процессах. Таким образом, диссертационная работа Шатова В. М., безусловно, является актуальной и практически значимой.

Работа Шатова В. М. имеет четко сформулированные цель и задачи. На первом этапе автором получены гомогенные препараты пяти sHsp человека дикого типа, десяти мутантных форм sHsp, пяти  $\alpha$ -кристаллиновых доменов (ACD) sHsp и белков 14-3-3 и BAG3, необходимых для проведения запланированных исследований. Следует отметить, что проделана очень объемная и трудоемкая работа, включающая получение ряда кодирующих последовательностей и плазмидных конструкций, клонирование целевых кДНК, экспрессию гетерологичных генов в клетках бактерий и очистку указанных рекомбинантных белков. С целью оптимизации процесса выделения полноразмерного HspB7 и его мутантных форм использована оригинальная методика, обеспечившая получение белка в растворимой форме, разработанная в рамках данной работы.

Автором получена принципиально новая информация о разном состоянии синтезированных в бактериях и очищенных ACD разных sHsp в растворе и выявлены ключевые позиции аминокислот, которые могут оказывать существенное влияние на прочность интерфейса димеризации ACD. Изучение взаимодействия между изолированными ACD и полноразмерными sHsp или мутантной формой HspB1 3D позволило выяснить, что ACD разных sHsp отличаются по способности встраиваться в состав олигомерных комплексов sHsp и продемонстрировать, что олигомерное состояние sHsp может регулироваться не только путем фосфорилирования, но и путем имитирующих фосфорилирование модификаций определенных аминокислот.

На следующих этапах основное внимание автор сфокусировал на изучении функциональной роли конкретных участков N-концевых доменов (NTD) sHsp. Четко продемонстрировано, что гетероолигомеризация белков HspB1, HspB5 и HspB6 человека контролируется консервативным участком, локализованным в NTD: замена Arg на Ala в консервативном мотиве SRLFDQxFG и делеция SRLFD приводят к принципиальным и разнонаправленным для разных sHsp изменениям в эффективности процесса гетероолигомеризации (облегчает процесс гетероолигомеризации HspB1 и HspB5, и, напротив, сопровождаются потерей способности HspB6 образовывать гетероолигомеры). При проведении сравнительного исследования HspB6 дикого типа и мутантных форм обнаружено, что точечные замены S10F или P20L в N-концевом домене, связанные с развитием кардиомиопатий, приводят к изменению физико-химических свойств HspB6 (гидрофобности и термостабильности) и повышению склонности к самоассоциации, что может приводить к изменению шапероноподобных



свойств HspB6 и, как следствие, уменьшению кардиопротекторной активности. При проведении анализа роли NTD в формировании олигомерной структуры ранее мало изученных HspB7 и HspB8 (содержащих уникальные последовательности в первичной структуре, не характерные для других sHsp и ACD, отличающиеся от доменов ACD других sHsp) с использованием делеционных мутаций в NTD HspB7 впервые продемонстрировано, что первые 29 аминокислотных остатков NTD играют важную роль в процессе агрегации или олигомеризации HspB7; показано, что в отличие от большинства других sHsp, HspB8 присутствует в растворе в виде мономера и его олигомерное состояние в основном определяется не NTD, а особенностями структуры ACD.

Шатов В. М. представил данные, наглядно демонстрирующие, что N-концевой домен sHsp может существенно влиять на физико-химические свойства и процессы гомо- и гетероолигомеризации этих белков. Кроме этого проведенный анализ показал, что sHsp человека, принадлежащие к одному семейству белков, демонстрируют существенно различающиеся характеристики, на которые влияет не только последовательность NTD, но и особенности структуры кристаллиновых доменов.

Характеризуя работу в целом, следует отметить, что представленное серьезное научное исследование выполнено на высоком методическом уровне с использованием широкого набора самых современных методов (биохимических, биофизических, молекулярно-биологических, микробиологических, методов биоинформатики), причем выбор методов полностью соответствует поставленным задачам, что свидетельствует о высокой квалификации соискателя. Выводы, сделанные автором, являются обоснованными и аргументированными. Исследование sHsp человека и принципов регуляции их функций имеет важное значение не только в плане развития фундаментальных представлений о функционировании сложных белковых систем, но и для понимания механизмов развития ряда патологических процессов, связанных с изменением уровней их шаперонной активности.

Результаты диссертационной работы были представлены в виде 8 статей в авторитетных международных рецензируемых журналах, а также в виде стендовых докладов на международных научных конференциях.

Диссертационная работа Шатова Владислава Михайловича «N-концевой домен малых белков теплового шока: участие в олигомеризации и белок-белковых взаимодействиях» является самостоятельным и завершенным исследованием и полностью соответствует требованиям, изложенным в п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор без сомнений заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия.

1 февраля 2024 г.

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник отдела молекулярных основ онтогенеза  
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова

Л.А. Новикова

