О Т З Ы В

официального оппонента Гривенникова Игоря Анатольевича на диссертацию Шатова Владислава Михайловича на тему: «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.

Актуальность избранной темы.

У многоклеточных организмов, включая человека, существует специальная система протеостаза, отвечающая за контроль различных этапов созревания и функционирования полипептидных цепей в клетке. Эта система состоит из специализированных белков-шаперонов или как их иногда называют белков теплового шока. Основной задачей белков теплового шока в клетке является поддержание и сохранение пространственных структур белков. В настоящее время известно несколько семейств шаперонов различающихся по своим свойствам и молекулярным массам. Так называемые малые белки теплового шока (sHsp) - широко распространённая группа АТР-независимых шаперонов с молекулярными массами от 12 до 43 кДа. К настоящему времени установлено, что sHsp принимают участие в таких процессах клеточного протеостаза, как стабилизация клеточного цитоскелета, регуляция сократительной активности мышц, апоптоз, поддержание редокс статуса клетки и ряде других. Основная функция sHsp заключается в экранировании гидрофобных участков на поверхности денатурированных белков, которые появляются в клетке при различных «неблагоприятных» воздействиях, таким образом предотвращая их агрегацию. Эта так называемая холдазная или шапероноподобная активность особенно важна в клетке в условиях сильного стресса, когда множество белков одномоментно теряют нативную структуру и могут

агрегировать с потерей их функциональной активности. Связывание малыми белками теплового шока субстратов в неправильной конформации позволяет предотвратить перегрузку системы АТР-зависимого рефолдинга белка и избежать губительных последствий для клетки. Показано, что мутации в генах sHsp коррелируют с развитием ряда наследственных заболеваний, таких как болезнь Шарко-Мари-Тута 2 типа, дистальная врожденная невропатия, катаракта, а также с различными видами кардиомиопатий. Для всех sHsp свойственна первичная структура, состоящая их трех частей. В центральной области sHsp, расположен консервативный α-кристаллиновый домен (ACD), обычно состоящий из 90-100 аминокислотных остатков. С N- и С-концов этот домен фланкирован мало консервативными последовательностями, так называемыми N-концевым (NTD) и С-концевым (CTD) доменами, чья длина и структура могут сильно отличаться у разных представителей этого семейства. Кроме того, sHsp обладают способностью формировать крупные гомо- и гетероолигомерные комплексы, достигающие иногда размеров до 1 000 кДа. Показано, что в ходе старения организма или сильного стресса функционирование системы протеостаза ослабевает, что неизбежно приводит к гибели клеток. Таким образом, исследование принципов функционирования системы шаперонов необходимо для понимания возникновения и течения ряда патологических процессов в клетке и поиска методов лечения многих заболеваний, связанных с возрастными изменениями. В настоящее время нет детального понимания механизмов участия различных доменов sHsp и в частности его N-концевого домена в процессе построения четвертичной структуры и функционирования этих белков. Однако установлено, что мутации в N-концевом домене sHsp сопряжены с развитием тяжелых наследственных заболеваний и многие из таких «горячих точек» в белке располагаются около или непосредственно в составе полуконсервативной последовательности, обозначаемой как sRLFDQxFG мотив. Все это указывает на целесообразность и важность

подробного изучения структуры и свойств N-концевых доменов различных sHsp.

В свете этого диссертационная работа Шатова В. М., посвященная анализу влияния делеций и точечных аминокислотных замен в N-концевом домене некоторых sHsp человека на их структуру, физико-химические свойства, процессы гомо- и гетероолигомеризации, а также взаимодействия с белками-партнерами, представляется важной и актуальной.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа Шатова В. М. изложена по стандартному плану и включает в себя введение, обзор литературы, описание используемых материалов и методов, изложение полученных результатов и их обсуждение, выводы, приложения (7) и список используемой литературы. Работа изложена на 111 страницах машинописного текста, содержит 39 рисунков, 4 таблицы и 180 ссылок цитированной литературы.

Глава «Введение» посвящена описанию состояния проблемы, обоснованию актуальности диссертационного исследования, постановке цели и задач работы. В этой главе также описаны: научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, достоверность полученных результатов и сформулированы положения, выносимые на защиту, приведены сведения об апробации работы и о количестве опубликованных по теме диссертации статей.

Глава «Обзор литературы» состоит из 6 основных подразделов. В начале автор кратко описывает систему протеостаза в эукариотических клетках. Далее Шатов В. М. переходит к изложению известных к настоящему времени данных относительно строения sHsp и их основных доменов. После этого автор логично переходит к описанию структуры гомо – и гетероолигомерных комплексов sHsp человека и роли N-концевого участка в регуляции их олигомерного состояния и шапероноподобной

активности. В последней части обзора диссертант излагает данные относительно взаимодействия sHsp с белками-партнерами, такими как белок 14-3-3 и BAG3. В целом обзор написан достаточно подробно, с привлечением источников литературы последних лет и, на мой взгляд, хорошо иллюстрирован. Чувствуется, что автор хорошо знаком с проблематикой, которой посвящена диссертационная работа. Тем не менее, мне кажется, что следовало более точно дать определение и описать локализацию мотива IxI в молекуле $sHsp_2$ представленную на рис. 3.

В главе «Материалы и методы» автор подробно описывает схемы и протоколы проведенных экспериментов. Работа проведена с использованием современных биохимических, биофизических и молекулярно-биологических методов. Среди методов, использованных в работе следует отметить следующие: создание генетических конструкций разных sHsp и их доменов, экспрессию генетических векторов в бактериальных системах, очистку и анализ соответствующих белковых продуктов методами хроматографии (гель-фильтрации и гидрофобной) и электрофореза (в разных условиях), флуоресцентные методы исследований, фосфорилирование белковых субстратов. В целом материал, изложенный в этой главе, свидетельствует о методической подготовленности автора к решению задач настоящей работы. В этом разделе на стр. 47 автору следовало бы указать, на каком приборе измеряли динамическое светорассеяние.

В главе «Результаты и их обсуждение» Шатов В. М. последовательно излагает результаты собственного исследования, не забывая сопоставить их с данными, полученными другими исследователями. На первом этапе автор подробно описывает результаты по экспрессии и выделению гомогенных препаратов разных sHsp.

К безусловной заслуге автора следует отнести выбор объектов исследования: были выбраны пять совместно экспрессирующихся в мышечной и сердечной ткани белков HspB1, HspB5, HspB6, HspB7 и HspB8,

которые были естественно экспрессированы и выделены. Кроме того, были экспрессированы, выделены и очищены соответствующие мутанты (точечные и делеционные) и α-кристаллиновые домены sHsp. Всего в данной главе присутствует 6 основных подразделов. В ходе выполнения работы было проведено подробное сравнение структуры и свойств пяти α-кристаллиновых доменов этих белков, а также была изучена роль N-концевого домена этих белков в процессах гомо- и гетероолигомеризации. В связи с тем, что по данным литературы точечные мутации вблизи sRLFDQxFG мотива HspB6 коррелируют с возникновением кардиомиопатий, молекулярный механизм которых оставался неизвестным, было проведено изучение физико-химических свойств указанных мутантных форм HspB6. Наконец, отдельное внимание в данной работе уделено свойствам N-концевого домена двух мало изученных белков, HspB7 и HspB8. Автор подробно исследует особенности строения и влияние N-концевого домена на встраивание α-кристаллиновых доменов в состав олигомеров полноразмерных sHsp, а также консервативного sRLFDQxFG мотива этого домена в образовании гомо- и гетероолигомерных комплексов sHsp. И, конечно, особое внимание уделено влиянию точечных мутаций S10F и P20L на физико-химические свойства одного из представителей sHsp (HspB6). В последнем подразделе данной главы говорится о белке Bag3. В оглавлении этот белок вообще не упоминается и весь подраздел посвящен в основном уникальным свойствам HspB7 и HspB8. Стоило ли вообще говорить о другом, «новом» белке и не упоминать его даже в названии соответствующего подраздела?

Основные полученные результаты и их оригинальность. В ходе выполнения диссертационной работы соискателем были получены важные и оригинальные результаты. Так, было показано, что α-кристаллиновые домены HspB1, HspB5, HspB6 в растворе представлены в виде равновесной смеси димеров и мономеров, а α-кристаллиновые домены HspB7 и HspB8,

напротив, преимущественно представлены в виде мономеров. Делеция консервативной последовательности SRLFD в составе N-концевого домена или замена аргинина на аланин в составе консервативного мотива дестабилизируют крупные гомоолигомеры HspB1 и HspB5 и увеличивают вероятность образования гетероолигомеров с HspB6. А вот аналогичная делеция или замена аргинина в N-концевом домене HspB6 затрудняют образование его гетероолигомеров с HspB1 и HspB5.

Автором продемонстрировано, что точечные аминокислотные замены S10F и P20L в N-концевом домене HspB6, коррелирующие с развитием кардиомиопатии, приводят к увеличению гидрофобности и усилению процесса самоассоциации в условиях краудинга. Из-за особенностей первичной структуры α-кристаллинового домена полноразмерный HspB8 в растворе представлен в виде мономеров, что отличает его от большинства других малых белков теплового шока.

В главе «Заключение» Шатов В. М. подводит итоги проведенной работы и отмечает перспективность разработанных подходов для дальнейших исследований. На основе полученных результатов автор приходит к заключению, что участие N-концевого домена малых белков теплового шока в процессах гомо- и гетероолигомеризации находится в эволюционной связи со строением и функциональными особенностями их α-кристаллиновых доменов, а также наличием или отсутствием IxI-мотива в их С-концевом домене. Все это в совокупности, по мнению автора, указывает на то, что среди 10 представителей семейства sHsp человека разделение по функциям происходит не только за счет их N-концевых доменов, но и во многом за счет специализации их α-кристаллиновых доменов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Шатовым В. М. установлена роль консервативного sRLFDQxFG мотива N-концевого домена в процессах гетероолигомеризации между HspB1, HspB5 и HspB6. Показано, что аминокислотные замены S10F и P20L в N-концевом домене HspB6,

коррелирующие с развитием кардиомиопатии у человека, влияют на физико-химические свойства и шапероноподобную активность белка. Разработана методика выделения рекомбинантного HspB7 человека и установлено, что N-концевой домен играет важную роль в ассоциации и агрегации этого белка. Определено, что в отличие от большинства малых белков теплового шока, HspB8 представлен в растворе в виде мономера. Полученные автором результаты могут быть использованы при чтении лекций по биохимии на Биологическом факультете МГУ им. М. В. Ломоносова и в ряде медицинских университетов нашей страны, а также при проведении практических занятий по биохимии белковых молекул.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений, поскольку они базируются на достаточном объеме экспериментального материала. Достоверность результатов подтверждается также их воспроизводимостью с использованием современных методов исследования и статистической обработки: на всех этапах применялись современные способы получения репрезентативных данных.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus или РИНЦ. Результаты работы были представлены на 2 международных симпозиумах.

Заключение. Диссертационная работа **Шатова В. М.** на тему **«N-концевой домен малых белков теплового шока: участие в олигомеризации и белок-белковых взаимодействиях»** является самостоятельной, завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи современной

биологической химии, связанной с установлением роли отдельных доменов ряда sHsp человека в их структуру и процессы гомо- и гетероолигомеризации. **По актуальности темы, методологическому подходу, объему выполненных диссертантом исследований, новизне полученных данных и их научно-практической значимости, достигнутым и опубликованным результатам, диссертационная работа Шатова Владислава Михайловича полностью соответствует критериям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.**

Официальный оппонент:
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник Лаборатории молекулярной
нейрогенетики и врожденного иммунитета
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

Гривенников Игорь Анатольевич

123182, г. Москва, пл. ак. Курчатова, д.2, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт») тел.: 8499-1960014, e-mail: iag.img@yandex.ru

Шифр и наименование специальности, по которой защищена диссертация: 1.5.3. – молекулярная биология; 3.3.6. – фармакология, клиническая фармакология.

Подпись Гривенникова И.А. заверяю,
Главный Ученый секретарь
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт» К.Е. Борисов

«12» января 2024 г.