

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу В.М. Шатова «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

Для поддержания нормальной структуры белков в клетке существует сложная система белков-шаперонов, на долю которых приходится до 10% всего протеома. Белки, входящие в эту группу и, в частности, малые белки теплового шока sHsp, препятствуют агрегации частично денатурированных белков и способствуют либо ренатурации денатурированных белков, либо протеолитической деградации денатурированных белков. Эти белки достаточно консервативны и играют важную роль в устойчивости к стрессу. Многие sHsp обладают шапероноподобной активностью, предотвращая агрегацию белков-мишеней, сохраняя их в состоянии спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру и рефолдинг, самостоятельно или совместно с другими АТФ-зависимыми шаперонами. Мутации в sHsp человека приводят к миопатиям, невропатиям и катаракте. Уровень экспрессии малых белков теплового шока изменяется при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и рак. Циркулирующие в плазме Hsp27 и α B-кристаллин, относящиеся к семейству малых белков теплового шока, могут проявлять иммуномодулирующее и противовоспалительное действие. α B-кристаллин и Hsp20 препятствуют агрегации тромбоцитов: эти положительные эффекты указывают на потенциальную возможность их использования в медицине.

Малые белки теплового шока обнаружены не только в тканях животных, но также в вирусах, бактериях и растениях. Геном человека содержит 10 генов малых белков теплового шока, часть из которых экспрессируется повсеместно, а для других характерна тканевая специфичность. Эти белки склонны образовывать как гомо - так и гетероолигомеры разного размера и состава и могут участвовать во многих процессах, происходящих в живой клетке. Вследствие этого мутации малых белков теплового шока зачастую коррелируют с развитием различных врожденных заболеваний. Поэтому предполагают, что целенаправленная модуляция их экспрессии и/или активности может быть использована в качестве стратегии лечения некоторых заболеваний человека, для чего необходимо

подробное изучение структуры и свойств малых белков теплового шока. В этой связи диссертационная работа В.М. Шатова, посвященная анализу белок-белковых взаимодействий малых белков теплового шока, особенно актуальна.

Диссертационная работа В.М. Шатова построена по традиционному плану и состоит из краткого введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, включающего выводы, списка литературы, содержащего 180 ссылок на отечественные и зарубежные публикации, и Приложения, включающего последовательности праймеров, использованных в работе, и профили элюции малых белков теплового шока дикого типа и их мутантных форм. Кроме того, в Обзор литературы включены 2 таблицы, содержащие краткие характеристики основных семейств шаперонов эукариот, описаны свойства мономеров и их функции (Таблица 1), а также приведены характеристики представителей семейства HspB человека (Таблица 2). Иллюстративный материал представлен 34 рисунками.

Обзор литературы (Глава 1) состоит из 6 разделов, часть которых разделена на подразделы. В первом разделе обзора литературы речь идет о системе протеостаза, которая состоит из белков-шаперонов (белков теплового шока), которые отличаются друг от друга молекулярной массой мономеров и функциями в клетке, но функционируют в тесной кооперации друг с другом и, дополняя друг друга, так что обширная сеть взаимодействующих компонентов активно противодействует денатурации белков в клетке. Принципы работы белков теплового шока основаны на способности шаперонов узнавать гидрофобные участки на поверхности белков, потерявших нативную структуру, связывать их и либо способствовать их ренатурации, либо избирательной протеолитической деградации. Далее в этом разделе обзора более подробно рассматриваются свойства представителей каждого семейства белков теплового шока.

В разделе 2 Обзора литературы рассматривается строение малых белков теплового шока: структура альфа-кристаллинового домена sHsp, С- и N-концевых участков, с более детальным обсуждением структуры N-концевых участков, поскольку установлено, что на конформацию N-концевой последовательности влияет множество факторов и она во многом зависит от локального окружения N-конца. В следующих разделах Обзора литературы (3-5) обсуждается строение высокомолекулярных комплексов sHsp человека (3), роль N-концевого участка в регуляции олигомерного состояния и шапероноподобной активности sHsp (4) и

гетероолигомерные комплексы малых белков теплового шока (5).
Заключительный (раздел 6) обзора литературы посвящен взаимодействию малых белков теплового шока с белками-партнерами: в частности, комплексу HspB6 с белком 14-3-3 в клетках гладкой мускулатуры и с белком-адаптером BAG-3. На основании этих данных в качестве объектов исследования в рассматриваемой работе были выбраны 5 белков, совместно экспрессирующихся в мышечной и сердечной ткани: HspB1, HspB5, HspB6, HspB7 и HspB8. В ходе выполнения работы было проведено подробное сравнение структуры и свойств пяти кристаллиновых доменов этих белков и изучена роль N-концевого домена этих белков в процессах гомо- и гетероолигомеризации. Кроме того, отдельное внимание было уделено свойствам N-концевого домена двух мало изученных белков теплового шока HspB7 и HspB8. В целом, обзор литературы содержит большое количество современной информации и свидетельствует о том, что автор хорошо знает литературу, свободно ориентируется в проблеме и использует эту информацию в своей экспериментальной работе.

В Главе 2 «Материалы и методы исследования» подробно описано множество методов и подходов, использованных в ходе выполнения работы: получение плазмид и генно-инженерных конструкций, приготовление компетентных клеток и их трансформация, экспрессия белков, выделение и очистка белков теплового шока и белков-партнеров, а также методы исследования структуры и свойств белков: оптические методы, определение шапероноподобной активности белков теплового шока, фосфорилирование HspB6 сАМР-зависимой протеинкиназой, методы анализа четвертичной структуры sHsp и кристаллиновых доменов, а также белок-белковые взаимодействия, исследования олигомерного состояния α -кристаллиновых доменов методом динамического светорассеяния и анализ олигомерного состояния α -кристаллиновых доменов методом химического сшивания. По-моему, этот раздел диссертации было бы полезно издать в виде отдельной публикации, снабдив ее необходимыми пояснениями и иллюстрациями.

Экспериментальная часть работы подробно описана и профессионально обсуждается в Главе 3 «Результаты и их обсуждение». Этот основной раздел диссертации состоит из 6 больших разделов и начинается описанием получения препаратов sHsp диких типов, их точечных и делеционных мутантов, а также препаратов их α -кристаллиновых доменов. Такой подход, непосредственно предшествующий описанию результатов работы, очень способствует восприятию

полученных результатов, представленных в следующих разделах Главы 3. Эти разделы включают анализ олигомерного состояния α -кристаллиновых доменов различных sHsp человека, встраивание изолированных α -кристаллиновых доменов в состав олигомеров полноразмерных sHsp, участие консервативного sRLFDQxFG мотива N-концевого домена в образовании гомо- и гетероолигомерных комплексов sHsp, влияние точечных мутаций S10F и P20L на физико-химические свойства HspB6 и особенности строения и свойства N-концевого домена HspB7 и HspB8. Таким образом, в ходе выполнения работы детально проанализировано влияние N-концевого и α -кристаллиновых доменов на свойства малых белков теплового шока. Показано, что консервативный мотив sRLFDQxFG в N-концевом домене играет важную роль в образовании гетероолигомеров малых белков теплового шока. Показано также, что в разных малых белках теплового шока делеции и аминокислотные замены могут дестабилизировать крупные олигомеры или способствовать их образованию. Существенным результатом диссертации является также вывод о том, что участие N-концевого домена малых белков теплового шока в процессах гомо- и гетероолигомеризации связано со строением и функциональными особенностями их α -кристаллиновых доменов, что определяет совместную функциональную роль этих доменов.

Автореферат диссертации очень хорошо написан. Как всегда в работах этой лаборатории, и методы, использованные в работе, и результаты работы описаны так подробно и аккуратно, что могут быть использованы в качестве методического пособия по работе с белками и белковыми комплексами. Полученные В. М. Шатовым новые данные о механизме образовании гетероолигомерных комплексов sHsp являются важной ступенью исследования роли этих белков в различных клеточных процессах.

Результаты диссертации достаточно полно изложены в 8 статьях в российских и международных рецензируемых журналах и тезисах докладов в материалах 2 международных конференций. Содержание автореферата полностью соответствует основным разделам диссертации. Таким образом, 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, является целостным завершённым исследованием, выполненным на высоком научном уровне. По актуальности,

объему выполненных исследований, методическому уровню проделанной работы, научной новизне и значимости полученных результатов диссертационная работа В. М. Шатова полностью соответствует основным квалификационным критериям и удовлетворяет всем требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024, от 01.10.2018 N 1168, от 20.03.2021 N 426, от 11.09.2021 N 1539, от 26.09.2022 N 1690, от 26.01.2023 N 101, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 N 751), а ее автор, Владислав Михайлович Шатов, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

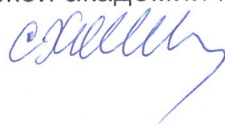
Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт цитологии Российской академии наук,

доктор биологических наук



София Юрьевна Хайтлина

Контактная информация: ФГБУН Институт цитологии РАН,

Санкт-Петербург 194064, Тихорецкий пр., 4.

Тел. 8-812-2972918, E.mail: Sofia Khaitlina [skhspb@gmail.com]

Шифр и наименование специальности, по которой защищена диссертация:

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология (1.5.22.- "Клеточная биология")

Подпись С.Ю. Хайтлиной заверяю,

Ученый секретарь

ФГБУН Института цитологии РАН

« 15 » января 2024 г.

