

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 08 февраля 2024 г. № 1
о присуждении Шатову Владиславу Михайловичу, гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «N-концевой домен малых белков теплового шока: участие в олигомеризации и белок-белковых взаимодействиях» по специальности 1.5.4. Биохимия принята к защите 06 декабря 2023 г. (протокол № 24) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк; от 10 февраля 2014 года № 55/нк; от 30.09.2015 №1166/нк; от 13 марта 2019 года № 222/нк; от 03.06.2021 №561/нк и 22 марта 2023 г. № 501/нк.

Соискатель

Шатов Владислав Михайлович в 2019 году окончил магистратуру кафедры биохимии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» с присуждением степени магистра по направлению 06.04.01 «Биология» по программе «Общая биохимия». С 2019 по 2023 гг. обучался в очной аспирантуре на кафедре биохимии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (Диплом об окончании аспирантуры АС 000207).

С 2017 года работает на кафедре биохимии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. В период 2017-2019 гг. работал лаборантом,

в период 2019-2023 гг. работал мастером ТСП. С 2023 года и по настоящее время работает на кафедре в должности младшего научного сотрудника.

Научный руководитель:

Гусев Николай Борисович, доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН.

Официальные оппоненты:

Гривенников Игорь Анатольевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Хайтлина София Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, профессор Гривенников Игорь Анатольевич является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования системы протеостаза и механизмов защиты клеток нервной системы от различных неблагоприятных воздействий и стресса.

тем, что доктор биологических наук Хайтлина София Юрьевна является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования структуры белка и белок-белковых взаимодействий.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Шатова В.М.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН» (ИБР РАН) в своем положительном отзыве, подписанном доктором биологических наук, профессором, главным научным сотрудником Авдониным П.В. и утвержденном и.о. директора ИБР РАН доктором биологических наук Шаровой Н.П., указало, что диссертационная работа Шатова В.М. является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Шатов В.М. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности – 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен с тем, что ФГБУ науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН» является признанным отечественным научным центром в

области молекулярной биологии и биохимии и имеет в своем составе несколько лабораторий, специализирующихся на исследовании белок-белковых взаимодействий в норме и патологии. Таким образом, сотрудники ФГБУ науки «Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН» и, в частности, лаборатории физиологии рецепторов и сигнальных систем являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, связанные с тематикой диссертационной работы Шатова В.М.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации.

Основные результаты диссертационной работы Шатова В.М. изложены в 8 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1: Муранова Л.К., Рыжавская А.С., Судницина М.В., **Шатов В.М.**, Гусев Н.Б. (2019) Малые белки теплового шока и нейродегенеративные заболевания человека. *Биохимия (Москва)*, 84(11), 1256–1267. IF 2.487 (WoS).

2: **Shatov V.M.**, Strelkov S.V., Gusev N.B. (2020) The heterooligomerization of human small heat shock proteins is controlled by conserved motif located in the N-terminal domain. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(12), 1–18. IF 5.923 (WoS).

3: **Shatov V.M.**, Gusev N.B. (2020) Physico-chemical properties of two point mutants of small heat shock protein HspB6 (Hsp20) with abrogated cardioprotection. *Biochimie*, 174, 126–135. IF 4.079 (WoS).

4: Муранова Л.К., **Шатов В.М.**, Букач О.В., Гусев Н.Б. (2021) Сердечно-сосудистый белок теплового шока (cvHsp, HspB7) - необычный представитель семейства малых белков теплового шока. *Биохимия (Москва)*, 86(S1), 1–11. IF 2.487 (WoS).

5: **Shatov V.M.**, Sluchanko N.N., Gusev N.B. (2021) Replacement of Arg in the conserved N-terminal RLFDQxFG motif affects physico-chemical properties and chaperone-like activity of human small heat shock protein HspB8 (Hsp22). *PLoS One*, 16(6), 1–15. IF 3.24 (WoS).

6: Muranova L.K., **Shatov V.M.**, Slushchev A.V., Gusev N.B. (2021) Quaternary structure and heterooligomerization of recombinant human small heat shock protein hspb7 (cvHsp). *Int. J. Mol. Sci.*, 22(15), 1–15. IF 5.923 (WoS).

7: Муранова Л.К., **Шатов В.М.**, Гусев Н.Б. (2022) Малые белки теплового шока и актиновые филаменты. *Биохимия (Москва)*, 87(8), 800–811. IF 2.487 (WoS).

8: **Shatov V.M.**, Muranova L.K., Zamotina M.A., Sluchanko N.N., Gusev N.B. (2023) alpha-Crystallin domains of five human small heat shock proteins (sHsps) differ in dimer stabilities and ability to incorporate themselves into oligomers of full-length sHsps. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(2), 1–15. IF 5.923 (WoS).

Результаты работы также были представлены на 2 международных конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций) в частности в виде стендовых и устных докладов на международном межлабораторном семинаре sHSP WOG Meeting in Leuven (Бельгия) в 2019 году и конгрессе IUBMB–FEBS–PABMB (Португалия) в 2022 году.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» **Гривенникова Игоря Анатольевича** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

- 1) 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, представленную на рис. 3.
- 2) В целом материал, изложенный в этой главе (Материалы и методы), 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.
- 3) В последнем подразделе данной главы (Результаты) 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?

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника ФГБУ науки Института цитологии РАН **Хайтлиной Софии Юрьевны** (положительный). Отзыв Хайтлиной Софии Юрьевны замечаний не содержит.

Отзыв **ведущей организации** Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН» (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 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) 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.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Матюшенко Александра Михайловича, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории структурной биохимии белка Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. **В отзыве имеется следующий вопрос:**

- 1) Существенная часть работы посвящена изучению влияния N-концевого фрагмента различных Hsp или его участков на олигомеризацию или гетеро-олигомеризацию комплексов малых белков теплового шока. Почему не были созданы конструкторы, содержащие изолированный N-концевой домен и не проанализированы их эффекты? Вместо этого в работе использовались ACD для изучения олигомерных состояний. Эти домены очень важны для формирования димерных интерфейсов и лишь опосредованно участвуют в олигомеризации. Если причина заключается в потенциально низкой стабильности таких пептидных препаратов, можно ли было получить препараты ACD вместе с N-концевыми доменами или стабилизированные другими белковыми тагами для изучения их влияния?

Чеботаревой Натальи Александровны, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории структурной биохимии белка Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Отзыв Чеботаревой Натальи Александровны замечаний не содержит.

Муронца Владимира Израилевича, доктора биологических наук, профессора, заведующего отделом биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. **В отзыве имеется следующее замечание:**

- 1) По автореферату есть небольшое замечание, которое не умаляет ценности проведенного исследования, и, возможно, касается только изложения результатов в такой краткой форме. К сожалению, новая классификация малых белков теплового шока усложнила знакомство с материалом, поскольку исчезло привычные наименования Hsp27, Hsp22 и так далее, что позволяло сразу оценивать размеры белков и соотнести полученные данные с более ранними работами. Может быть имело смысл хотя бы при первом упоминании дать и старую номенклатуру.

Ширинского Владимира Павловича, доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника, и.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности Института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России.

Отзыв Ширинского Владимира Павловича замечаний не содержит.

Новиковой Людмилы Александровны, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника отдела молекулярных основ онтогенеза НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

Отзыв Новиковой Людмилы Александровны замечаний не содержит.

В дискуссии приняли участие:

- 1) Проф., д.б.н. Шумянцева В.В.
- 2) Проф., д.б.н. Юрина Н.П.
- 3) Д.б.н. Чеботарева Н.А.
- 4) Д.х.н. Безсуднова Е.Ю.
- 5) Д.б.н. Терёшина В.М.
- 6) Проф., д.б.н. Шишкин С.С.
- 7) Проф., д.б.н. Гривенников И.А.
- 8) Проф., д.б.н. Левицкий Д.И.
- 9) Проф., д.б.н. Лопина О.Д.
- 10) Проф., д.х.н. Дзантиев Б.Б.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

- 1) α -кристаллиновые домены HspB1 (B1ACD), HspB5 (B5ACD) и HspB6 (B6ACD) в растворе представлены в виде димеров, а α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 - в виде мономеров. Прочность интерфейса димеризации α -кристаллиновых доменов убывает в ряду B1ACD>>B5ACD>B6ACD.
- 2) Введение отрицательных зарядов в N-концевой домен HspB1 приводит к дестабилизации крупных олигомеров, что способствует включению изолированных α -кристаллиновых доменов в состав олигомера.
- 3) Консервативный мотив sRLFDQxFG в N-концевом домене играет важную роль в формировании гетероолигомеров малых белков теплового шока. Делеция SRLFD или замена R/A в случае HspB1 и HspB5 дестабилизирует крупные олигомеры и облегчает формирование гетероолигомеров с HspB6. Аналогичная делеция и замена R/A в HspB6 наоборот затрудняют формирование гетероолигомеров с HspB1 и HspB5.
- 4) Точечные аминокислотные замены S10F и P20L в N-концевом домене HspB6, ассоциированные с развитием кардиомиопатий, приводят к увеличению поверхностной гидрофобности, усилению самоассоциации и увеличению шапероноподобной активности на модельных белках-субстратах, но не влияют на способность HspB6 образовывать гетероолигомеры с HspB1 и HspB5.
- 5) HspB7 в растворе представлен в виде малых олигомеров, а HspB8 - в виде мономеров. Первые 29 N-концевых остатков могут участвовать в олигомеризации и агрегации HspB7. Необычное олигомерное состояние HspB8 определяется в первую очередь особенностями структуры его α -кристаллинового домена.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

- Проведен детальный анализ роли различных участков N-концевого домена в формировании четвертичной структуры гомо- и гетероолигомеров разных малых белков теплового шока человека
- Установлено, что α -кристаллиновые домены HspB1, HspB5 и HspB6 представлены в виде равновесной смеси мономеров и димеров, а α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 преимущественно представлены в виде мономеров.
- Выявлена роль консервативного sRLFDQxFG мотива N-концевого домена в процессах гетероолигомеризации между HspB1, HspB5 и HspB6.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

- Установлено, что аминокислотные замены S10F и P20L в N-концевом домене HspB6, коррелирующие с развитием кардиомиопатии, 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.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Заключение.

Диссертация Шатова В.М. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого набора современных методов, постановкой логически обоснованных задач, взаимосвязанностью сделанных выводов и полученных результатов. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, опубликованы в ведущих рецензируемых журналах (8 статей). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и представляет интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

На заседании 8 февраля 2024 года диссертационный совет принял решение присудить Шатову Владиславу Михайловичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве __21__ человек, из них __14__ докторов биологических наук, __6__ докторов химических наук по специальности

рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени – __21__ ,

«Против» – _нет_ ,

Недействительных бюллетеней – _нет_ .

Заместитель председателя
диссертационного совета
ФИЦ биотехнологии РАН
доктор химических наук, профессор



Б.Б.Дзантиев

Ученый секретарь диссертационного совета
ФИЦ биотехнологии РАН
кандидат биологических наук



А.Ф.Орловский

«8» февраля 2024 г.