

«УТВЕРЖДАЮ»:

Проректор-
МГУ имени М.В.Ломоносова



А.А. Федянин
А.А. Федянин

16 октябрь
2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Диссертация «N-концевой домен малых белков теплового шока: участие в олигомеризации и белок-белковых взаимодействиях» выполнена на кафедре биохимии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

В период подготовки диссертации (с 01.10.2019 г. по 01.10.2023 г.) Шатов Владислав Михайлович обучался в очной аспирантуре на кафедре биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности 1.5.4 – «Биохимия», а также работал на кафедре биохимии в должности мастер ТСП.

Диплом об окончании аспирантуры, подтверждающий сдачу кандидатских экзаменов, выдан в 2023 г. федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель – Гусев Николай Борисович, д.б.н., профессор кафедры биохимии биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

По итогам обсуждения принято следующее заключение.

1. Актуальность работы

Малые белки теплового шока (sHsp) - широко распространённая группа АТР-независимых шаперонов. sHsp принимают активное участие в таких процессах клеточного протеостаза, как стабилизация клеточного цитоскелета, регуляция сократительной активности мышц, апоптоз, поддержание RedOx статуса клетки и многих других процессах. sHsp экранируют гидрофобные участки на поверхности денатурированных белков, предотвращая их агрегацию. Эта так называемая холдазная (holdase) активность (по-другому, шапероноподобная активность) особенно важна в клетке в условиях сильного стресса, когда множество белков одновременно теряют нативную структуру и могут массово агрегировать. Связывание субстратов в неправильной конформации малыми белками теплового шока позволяет предотвратить перегрузку системы АТР-зависимого рефолдинга белка и избежать пагубных последствий для жизнедеятельности клетки. Мутации в генах sHsp часто коррелируют с развитием таких наследственных заболеваний, как болезнь Шарко-Мари-Тута 2 типа, дистальная врожденная невропатия, катаракта, а также с различными видами кардиомиопатий.

В геноме человека обнаружены 10 генов, кодирующих белки этого семейства. Для всех sHsp свойственна небольшая молекулярная масса мономеров (17-23 кДа) и первичная структура, состоящая из трех частей. В центральной области sHsp, расположен консервативный α -кристаллиновый домен (ACD), обычно состоящий из 90-100 аминокислотных остатков. С N- и C-концов этот домен фланкирован мало консервативными последовательностями, так называемыми N-концевым (NTD) и C-концевым (CTD) доменами, чья длина и структура могут сильно отличаться у разных представителей этого семейства.

Отличительной особенностью sHsp является их способность к олигомеризации и формированию сложноорганизованных мультисубъединичных комплексов, включающих до 40 субъединиц.

Считается, что сложная четвертичная структура формируется за счет нескольких типов взаимодействий. На первом этапе происходит взаимодействие между антипараллельно ориентированными $\beta 7$ складками α -кристаллиновых доменов двух мономеров. Далее, при наличии IxI-мотива в С-концевом участке, димеры могут объединяться в тетрамеры/гексамеры за счет взаимодействия IxI последовательности одного мономера с $\beta 4/\beta 8$ канавкой α -кристаллинового домена соседнего мономера. Некоторые малые белки теплового шока способны формировать еще более крупные комплексы за счет взаимодействия их N-концевых участков. Кроме того, подвижные N-концевые домены также необходимы для формирования гетероолигомерных комплексов, обеспечивая взаимодействие между субъединицами ортологичных белков.

Детальное понимание механизмов участия N-концевого домена в процессе построения четвертичной структуры sHsp остается еще недостаточно изученным во многом из-за высокой подвижности и внутренне разупорядоченной структуры этого участка. Мутации в N-концевом домене 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, в начале N-концевого домена многих sHsp. Все это делало целесообразным подробное изучение структуры и свойств N-концевых доменов различных малых белков теплового шока.

Целью данной работы был анализ влияния делеций и точечных аминокислотных замен в N-концевом домене некоторых sHsp человека на их структуру и физико-химические свойства, процессы гомо- и гетероолигомеризации, а также взаимодействия с белками-партнерами.

2. Научно-практическое значение

Проведен детальный анализ роли различных участков N-концевого домена в формировании четвертичной структуры гомо- и гетероолигомеров разных малых белков теплового шока человека. Исследована олигомерная структура α -кристаллиновых доменов HspB1, HspB5, HspB6, HspB7 и HspB8. В отличие от принятого в литературе мнения о стабильности структуры димеров α -кристаллиновых доменов, 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. 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. Определено, что в отличие от большинства малых белков теплового шока, HspB8 представлен в растворе в виде мономера.

3. **Личный вклад соискателя** присутствует на всех этапах работы, начиная от отработки используемых методик и завершая получением экспериментальных данных, их обработки, обсуждения результатов, подготовки статей и тезисов конференций;

4. Постановка цели и задач работы, подготовка обзора литературы и обсуждение основаны на анализе актуальных публикаций по теме исследования. **Достоверность результатов**, полученных в ходе работы, подтверждается воспроизводимостью измерений, согласованностью результатов, полученных с использованием различных современных физико-химических методов исследования белков;

5. Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены корректно.
6. Диссертационное исследование по своему содержанию соответствует заявленной специальности 1.5.4. Биохимия.
7. **Апробация работы.** Результаты работы были доложены на заседаниях кафедры биохимии Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, межлабораторном семинаре sHSP WOG Meeting в 2019 г. (Лёвен, Бельгия) и на 46-м Международном Конгрессе FEBS в 2022 г. (Лиссабон, Португалия).
8. **Публикации.** Основные идеи и положения работы изложены в 8 научных работах автора общим объемом 106 п.л. в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК и рекомендованных для защиты по специальности 1.5.4. Биохимия.

Список публикаций

Статьи в рецензируемых журналах из списка базы данных Web of Science (WoS)

- 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 hetero-oligomerization 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)**.

Тезисы докладов

1: **Shatov V.M.** (2019) Effect of conservative motif located in the N-terminal region of small heat shock proteins on their heterooligomerization, **sHSP WOG Meeting in Leuven**

2: Muranova L.K., **Shatov V.M.**, Slushchev A.V., Gusev N.B. (2022) Some properties of human small heat shock protein HspB7, **IUBMB–FEBS–PABMB Congress, Lisbon, Portugal, 9-14 July 2022**

В своих научных трудах соискатель впервые показал, что, несмотря на значительное сходство первичных структур, α -кристаллиновые домены малых белков теплового шока различаются по своей способности к димеризации. В ходе выполнения исследования было показано, что sRLFDQxFG мотив, расположенный в N-концевом домене, оказывает влияние как на формирование гомо-, так и гетероолигомеров малых белков теплового шока. Точечные мутации S10F и P20L приводят к увеличению гидрофобности малого белка теплового шока HspB6, что может быть одной из причин возникновения кардиомиопатии. Разработан метод получения рекомбинантного малого белка теплового шока HspB7 и установлено, что его

N-концевой домен играет важную роль в олигомеризации этого белка. Получены оригинальные данные об олигомерном состоянии малого белка теплового шока HspB8 и его взаимодействии с белком-адаптером Bag3.

Рекомендуемые 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 Института цитологии Российской академии наук.

Рекомендуемая ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН»

Диссертационная работа Шатова В.М. «N-концевой домен малых белков теплового шока: участие в олигомеризации и белок-белковых взаимодействиях» является законченным научно-квалификационным исследованием и отвечает всем требованиям, изложенным в п.9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Правительством РФ от 24.09.2023 г. №842, и может быть представлена для защиты на заседании диссертационного совета 24.1.233.01. на базе Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН. Работа отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и может быть представлена к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Принято решение рекомендовать диссертационную работу Шатова Владислава Михайловича «N-концевой домен малых белков теплового шока: участие в олигомеризации и белок-белковых взаимодействиях» к защите на

соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на заседании кафедры биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Присутствовало на заседании 20 чел. Результаты голосования: «за» - 20 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет, протокол № 6 от «3» апреля 2023 г.

Заведующий кафедрой биохимии
Биологического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова
доктор биологических наук, профессор



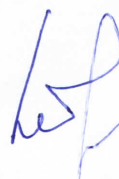
А.Г. Катруха

Ученый секретарь кафедры,
к.б.н., доцент



Е.А. Владыченская

ученый секретарь
Биологического факультета,
зав. научно-организационным отделом



Е.В. Петрова