

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Мурановой Лидии Константиновны «Влияние точечных мутаций и некоторых посттрансляционных модификаций на структуру и свойства малых белков теплового шока человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Актуальность.

Малые белки теплового шока или, по современной классификации, HspB широко распространены в живой природе и обнаружены у архей и бактерий, у растений и животных, в том числе у человека. Столь широкое распространение HspB обусловлено базовыми функциями этих белков в клетках. Они способны предотвращать агрегацию частично денатурированных белков при различных видах стрессорных воздействий, в частности, в условиях экстремальной температуры. Таким образом, эти белки участвуют в регуляции стабильности протеома клетки. Для них характерно также участие в регуляции апоптоза, в поддержании окислительно-восстановительного баланса клетки, в стабилизации цитоскелета, регуляции Ca^{2+} транспорта в сердечной мышце. Представители группы HspB составляют основную белковую часть хрусталика глаза, обеспечивая его прозрачность и, таким образом, непосредственно участвуют в реализации зрения и функционировании важнейшего информационного канала у высших животных.

Мутации в генах HspB зачастую ассоциированы с серьезными заболеваниями, такими как наследственные кардиомиопатии, нейропатии, миопатии, боковой амиотрофический склероз, наследственная катаракта. Исследования показывают, что диабетическая катаракта, развивающаяся в условиях окислительного стресса, сопутствующего диабету, вероятно, связана с химическим повреждением α -кристаллинов, типичных представителей семейства малых белков теплового шока.

Изучение роли мутаций в генах малых белков теплового шока в развитии болезней позволяет создать предпосылки для разработки в будущем адекватных методов лечения, например, на основе редактирования генома или других молекулярно-генетических подходов. Понимание механизмов регуляции структуры и функции шаперонов посредством посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, ацетилирование и др., а также интерференции с этими физиологическими механизмами патологических химических модификаций HspB важно для разработки новых фармакологических подходов к лечению диабета и ряда других социально значимых заболеваний. И, разумеется, накопление фундаментальных знаний о молекулярных механизмах функционирования шаперонов способствует поступательному развитию всей этой проблемной области. В связи с этим диссертационная работа Л.К. Мурановой, нацеленная на решение конкретных вопросов,

связанных с наследственными и приобретенными нарушениями в системе малых белков теплового шока, является несомненно актуальной.

Целью диссертационного исследования Л.К. Мурановой стал сравнительный анализ структуры и физико-химических свойств некоторых мутантных форм белка HspB1 с заменами аминокислотных остатков в N-концевом и α -кристаллиновом доменах, экспрессия которых коррелирует с нейропатией Шарко-Мари-Тутса II типа, а также мутантных форм белка HspB5 с заменами в N-концевом домене, ассоциированных с катарактой. Дополнительно была поставлена цель проанализировать влияние метилглиоксаля (МГО), продукта метаболизма глюкозы, накапливающегося при нарушениях углеводного обмена, в частности, при диабете, на свойства малого белка теплового шока HspB6.

В задачи исследования входило:

1. Получить гомогенные препараты рекомбинантных белков HspB1, HspB5, HspB6 дикого типа и их мутантные формы, а также препарат рекомбинантного HspB6, модифицированного МГО.
2. Изучить влияние мутаций и химической модификации метилглиоксалем на спектральные свойства исследуемых белков, их термостабильность и фосфорилирование рядом протеинкиназ *in vitro*.
3. Проанализировать влияние мутаций и химической модификации на способность HspB образовывать гетероолигомерные комплексы с другими малыми белками теплового шока и проявлять шаперонную активность *in vitro*.

Методы.

Все варианты HspB и ряд других использованных в работе белков автор получил методами молекулярного клонирования и экспрессии в бактериальной системе. Затем белки были очищены до 90-95% чистоты с помощью классических биохимических методов (фракционирование сульфатом аммония, различные виды хроматографии, электрофорез, концентрирование, центрифугирование). Таким образом были получены белки дикого типа и мутанты, содержащие следующие аминокислотные замены: HspB1(G34R), HspB1(P39L), HspB1(E41K), HspB1(R127W), HspB1(S135F), HspB1(R136W), HspB5(R11H), HspB5(P20S), HspB5(R56W), а также HspB6, модифицированный МГО.

Для решения поставленных задач автор использовал широкий спектр биохимических и физико-химических методов исследования, а именно, анализ спектров поглощения, собственной флуоресценции белка и флуоресценции меток (bis-ANS), метод динамического

лазерного светорассеяния, метод аналитического ультрацентрифугирования, химическое сшивание белков, гель-фильтрацию, ионообменную и гидрофобную хроматографию, электрофорез белков и нуклеиновых кислот в различных системах, фосфорилирование белков *in vitro*, автордиографию, масс-спектрометрию и ряд других подходов.

Методическое оснащение диссертационной работы соответствует поставленным задачам. Обилие количественных методов характеристики белков и их взаимодействий убеждает в том, что результаты, полученные с помощью такого арсенала современных научных подходов, являются достоверными.

Основные результаты работы.

1. Обнаружено, что аминокислотные замены в альфа-кристаллиновом домене (ACD) HspB1 в результате мутаций в его гене приводят к дестабилизации его олигомеров низкого порядка за счет нарушения правильной упаковки мономеров. При высокой концентрации мутантные HspB1 могут образовывать олигомеры, в том числе, высокого порядка, но они также нестабильны и разрушаются при более низкой степени фосфорилирования, чем в случае HspB1 дикого типа. Мутации в N-концевом домене (NTD) HspB1, напротив, стабилизируют высокомолекулярные олигомеры таким образом, что требуется повышенное фосфорилирование составляющих их мономеров HspB1 для диссоциации таких крупных олигомерных комплексов. Аналогично, связанные с патологией (наследственная катаракта) аминокислотные замены в NTD другого представителя HspB, HspB5 (альфаВ-кристаллина), также способствуют формированию крупных и стабильных олигомеров этого белка. В отличие от HspB1 автору не удалось показать влияния фосфорилирования HspB5 на динамику его олигомеров в связи с крайне низкой эффективностью фосфорилирования этого белка МАП киназами (МАРКАР2, р42/44) в различных условиях.

2. Такие физико-химические свойства изученных малых белков теплового шока HspB1 и HspB5 с аминокислотными заменами, ассоциированными с патологией, предполагали нарушение функциональных свойств этих белков. Диссертант исследовал этот вопрос и показал, что нарушается обмен субъединицами между разными HspB *in vitro* и образование гетероолигомеров. Так, почти все изученные мутанты HspB1 по ACD легко вступали в гетероолигомеризацию с HspB6, что дополнительно свидетельствует о слабой связи мутантных мономеров HspB1 между собой. При этом преимущественно образовывались ~100 кДа олигомеры, в то время как HspB1 и HspB6 дикого типа образовывали два варианта олигомеров: ~100 кДа и ~300 кДа комплексы. С другой стороны, HspB1 с аминокислотной заменой R136W вообще не взаимодействовал с HspB6 даже при повышенной температуре,

что, вероятно, связано с наличием «гидрофобного замка» в области контакта мономеров этой мутантной формы малого белка теплового шока B1.

Мутантные формы HspB1, содержащие точечные замены в NTD, также могли гетероолигомеризоваться с HspB6, однако в этом случае формировались очень крупные комплексы (~410 кДа), превышающие по размерам гетероолигомеры из белков дикого типа. При этом комплексы малого размера (~100 кДа), формирующиеся в случае HspB1 форм с заменами в ACD, не наблюдались. Эти данные свидетельствуют о том, что в результате ассоциированных с нейропатией замен R127W, S135F и R136W в HspB1 сдвигается равновесие в сторону образования олигомеров большого размера.

Для HspB5 автор проверил *in vitro* возможность гетероолигомеризации с HspB4, который также экспрессируется в хрусталике глаза. Оказалось, что эти белки тоже вступают в обмен субъединицами и могут образовывать гетероолигомерные комплексы. В отличие от комплексов из белков дикого типа мутантные формы HspB5 формируют более гетерогенную смесь олигомеров как по размеру и/или заряду, так и по относительному содержанию в их составе HspB4.

Важнейшим свойством HspB считается их шаперонная активность. Она была проверена автором в модельных экспериментах *in vitro* для HspB1, HspB5 и их мутантных форм. Внесение аминокислотных замен в структуру HspB1 или HspB5 нарушало шаперонную активность этих белков как в сторону повышения, так и в сторону снижения. Результат зависел от природы используемого субстрата. В основном, замены, связанные с патологическими мутациями в генах HspB1 и HspB5, снижали шаперонную активность этих белков *in vitro*.

3. Помимо изучения влияния наследственных факторов на структурно-функциональные свойства малых белков теплового шока диссертант продемонстрировал возможность нарушения функции HspB6 при его химической модификации метилглиоксалем, дикарбонилем, накапливающимся в организме при нарушениях обмена глюкозы, в частности, при диабете. По данным масс-спектроскопического анализа МГО преимущественно модифицировал три остатка аргинина в NTD HspB6. Эти модификации не отразились на способности HspB6 к гетероолигомеризации с HspB1, однако в значительной степени было подавлено фосфорилирование модифицированного HspB1 цАМФ-зависимой протеинкиназой. Интересно, что шаперонная активность глубоко модифицированного МГО HspB1 в отношении субфрагмента-1 миозина скелетных мышц была несколько повышена, возможно, за счет появления на поверхности HspB1 дополнительных мест узнавания субстрата.

По результатам работы автор сделал обобщающее заключение, что точечные мутации, коррелирующие с врожденными заболеваниями, и химические модификации могут нарушать нормальное функционирование малых белков теплового шока, влияя на их олигомерную структуру, регуляцию активности под действием фосфорилирования, а также на способность взаимодействовать с белками-партнерами и белками-мишенями.

Полученные автором данные существенно углубляют знания о механизмах действия малых белков теплового шока. В результате проведенных Л.К. Мурановой исследований появилось молекулярное обоснование действия ряда патологических мутаций в генах HspB1 и HspB5. Стало понятно, что аминокислотные замены в этих белках, ассоциированные с наследственной нейропатией Шарко-Мари-Тутса II типа и с наследственной каратактой, влияют на процессы гомо- и гетероолигомеризации малых белков теплового шока, регуляцию их агрегатного состояния путем фосфорилирования и на их шаперонную активность. Все эти события могут вносить вклад в развитие перечисленных патологий, однако, какие именно процессы с участием мутантных форм HspB1 и HspB5 происходят абберрантно в организме предстоит выяснять уже в других исследованиях и на других моделях. Диссертант также продемонстрировал, что химическая модификация HspB6 под действием метилглиоксала влияет на функциональные свойства этого белка, в частности, нарушая его регуляцию фосфорилированием. Эти данные демонстрируют возможные молекулярные механизмы, опосредующие нарушения клеточных функций при диабете, в том числе, при диабете II типа, приобретающем характер эпидемии в современном обществе. При этом заболевании отмечается накопление МГО, ассоциирующееся с развитием диабетической васкулопатии, нейропатии и ретинопатии. Таким образом, работа Л.К. Мурановой задает вектор дальнейших исследований роли малых белков теплового шока в развитии наследственных и приобретенных патологий в контексте клеточных и животных моделей.

Основные замечания и вопросы по сути работы Л.К. Мурановой следующие.

1. Модификация HspB6 метилглиоксалем проводилась при достаточно высокой концентрации МГО – 500 мкМ. В тканях при диабете, согласно измерениям с помощью ВЭЖХ и масс-спектропии, достигается концентрация МГО порядка 3 мкМ (Scheijen and Schalkwijk, 2014; Fleming et al., 2012). Насколько выражена может быть модификация HspB6 МГО при его патологических уровнях *in vivo*? Насколько полученные автором результаты соотносятся с возможной ситуацией в организме больного диабетом?

2. При выполнении экспериментов по химической сшивке HspB1 и HspB6 в последнем произведена замена E116C для реализации сшивки. Насколько такая замена могла изменить структуру HspB6 и повлиять на формирование гетеродимера с HspB1?

3. Рис. 26. Влияние мутаций в ACD на зависимые от фосфорилирования изменения четвертичной структуры HspB1. Интересно было бы также видеть данные по хроматографии комплексов HspB1 дикого типа при уровне его фосфорилирования около 1 мольР/моль белка, такого же уровня, который указан для всех мутантных форм HspB1.

4. Что обозначает Pdi на панели Г рис. 29?

5. Поскольку некоторые олигомерные комплексы HspB1 не отличаются стабильностью, насколько велика вероятность, что они видоизменяются в процессе хроматографии за счет «растаскивания», т.е. отделения олигомеров различного размера и отхождения их друг от друга при хроматографии без возможности реассоциации? Аналогично, насколько при ионообменной хроматографии гетерокомплексов HspB5 и HspB4 условия хроматографии могли повлиять на перераспределение HspB4 из гетерокомплекса на DEAE-целлюлозу?

6. Обмен субъединицами между различными HspB изучали при температурах 0°C и 42°C. Насколько эффективно идет такой обмен при 37°C, т.е. при нормальной температуре тела человека?

7. Рис. 42. На панели а измеряли A420, на других - A340, почему?

8. Рис. 47. Отсутствие тепловой денатурации HspB6, слабо модифицированного МГО можно также объяснить внутримonomерными сшивками в HspB6, препятствующими его разворачиванию при высокой температуре.

9. Рис. 51. Здесь автором представлен «Гипотетический механизм развития шаперонопатий....». Скорее, представлены гипотетические механизмы, их несколько.

Структура и оформление работы.

Диссертационная работа Л.К. Мурановой изложена на 123 страницах и написана по традиционному плану. Она включает введение, обзор литературы, раздел материалы и методы, раздел результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературы (173 источника). Работа снабжена 51 рисунком.

Обзор литературы написан достаточно компактно (около 30 стр.) хорошим языком и иллюстрирован 19 рисунками и схемами, помогающими читателю лучше понять суть проблемы и направление работы автора. Этот раздел работы демонстрирует, что диссертант хорошо владеет литературным материалом в своей области и в смежных областях. В целом, обзор литературы успешно выполняет роль подготовки читателя к восприятию экспериментальной части работы.

Раздел материалы и методы отличается обстоятельностью в изложении использованных подходов. Приведенные в нем протоколы очень подробные и снимают многие вопросы, возникающие при ознакомлении с экспериментальной частью работы.

Раздел результаты и их обсуждение занимает основную часть диссертации и показывает, какую объемную работу провел автор при исследовании белков семейства HspB. Этот раздел содержит большое количество первичных данных (хроматограмм, электрофореграмм, спектров поглощения и флуоресценции). Их качество свидетельствует о тщательности работы автора и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов. Также в этом разделе приведен ряд вспомогательных схем, обосновывающих логику экспериментов, проводимых автором, и облегчающих восприятие полученных результатов.

Обсуждение результатов выполнено параллельно представлению данных экспериментов. Все существенные находки автора сопоставлены с данными литературы и корректно интерпретированы.

Заключение написано очень кратко и фактически суммирует в предложенной схеме (рис. 51) все экспериментальные данные, полученные диссертантом.

По результатам работы сформулировано 6 выводов. Они адекватно отражают суть полученных автором результатов. Вывод 6 обобщающий и, по моему мнению, лучше вписывается в раздел Заключение.

По оформлению диссертационной работы Л.К. Мурановой имеются следующие замечания. В тексте встречается немало опечаток, например, на стр. 2, 30, 47-49, 81, 104. На стр. 97 указан рис. 26Б б вместо рис. 27Б б. При наличии русскоязычного эквивалента следует использовать его и писать цАМФ-зависимая протеинкиназа, а не сАМР-зависимая протеинкиназа и не сАМР-зависимая протеинкиназа А. На рис. 4 не обозначены панели а и б, упомянутые в подписи к рисунку. Обозначения фосфорилируемых остатков в белках следует писать единообразно и в диссертации желательно по-русски, а не в разных форматах - Ser¹⁶, Ser15, серин-82 (с. 32, 33). На с. 42 в тексте указан рис. 9 вместо рис. 20. На с. 58 автор пишет, что метод нативного электрофореза по Дэвису представляет собой дисковую систему для разделения белков. Вероятно, не дисковую, а прерывистую от английского discontinued, т.е. с резким перепадом пористости геля, рН и подвижности ионов на границе концентрирующего и разделяющего геля. На сс. 64-64 упоминается реагент ТМАО, но не дается его расшифровка ни здесь, ни в списке сокращений. Рис. 31, на панели В должно быть обозначение P29L вместо P20S. На с. 77 вместо рис. 33 следует указать рис. 30. Подпись к рис. 47 (в отношении подписей к другим рисункам такое же замечание): не совсем удобно для читающего, когда обозначение панели (а, б, в и т.д.) идет в конце описания всех условий

для этой панели. Имеет смысл вначале указывать панель, а затем описывать, что на ней представлено.

Замечания по сути и оформлению диссертационной работы не являются принципиальными и не снижают ценности полученных автором данных. Результаты работы были представлены автором на российских и международных конференциях и опубликованы в 5 статьях в рейтинговых российских и международных журналах. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

Заключение.

Таким образом, диссертационная работа Л.К. Мурановой «Влияние точечных мутаций и некоторых посттрансляционных модификаций на структуру и свойства малых белков теплового шока человека», несомненно, является законченной высококачественной научно-квалификационной работой, выполненной непосредственно диссертантом. Работа отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова для диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.04 – «Биохимия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Соискатель Муранова Лидия Константиновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Главный научный сотрудник
и.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
Национального медицинского исследовательского
центра кардиологии Минздрава России
доктор биологических наук, профессор

В.П. Ширинский

18.09.2019

«Подпись д.б.н., профессора В.П. Ширинского заверяю»

Ученый секретарь ИЭК НМИЦ кардиологии МЗ РФ
доктор медицинских наук

О.С. Плеханова

18.09.2019

