

## ОТЗЫВ

На автореферат диссертации П.Н. Дацкевича «Исследование структуры и свойств флуоресцентных химер малых белков теплового шока человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук

По специальности 03.01.04 – биохимия

Белки теплового шока обнаружены во всех организмах от бактерий до человека и выполняют очень важные функции в клетке, участвуя в поддержании внутриклеточного гомеостаза. В диссертационной работе П.Н. Дацкевича подробно проанализированы свойства малых белков теплового шока человека sHspB1, sHspB5, sHspB6 и sHspB8 с помощью химер с флуоресцентными белками ECFP или EYFP. Полученные данные, несомненно, носят своевременный и приоритетный характер.

Результаты работы изложены в виде пяти подразделов. Первые два подраздела посвящены описанию методической работы, в ходе которой впервые были подобраны оптимальные условия экспрессии химерных белков с очень высоким выходом (до 120 мг белка из 1 л бактериальной культуры). Стандартные методы экспрессии не позволяли получать химеры в таких количествах. Также автором была предпринята попытка увеличить выход С-концевых химер, склонных к агрегации, методом поэтапной ренатурации. Однако спектральные свойства таких химер значительно отличались от белков, полученных из растворимой фракции, что не позволило использовать их в дальнейших исследованиях.

В третьем подразделе автор анализирует олигомерное состояние химерных белков. Установлено, что присоединение химерного белка к sHsp, влияет на его четвертичную структуру, которая во много определяет функциональную активность малых белков теплового шока. Выявлена следующая закономерность: если белки в норме формируют небольшие олигомеры (HspB6, HspB8), то четвертичная структура химеры этого белка практически не изменялась. В то же время химеры тех белков, которые в норме образуют крупные комплексы (HspB1, HspB5), формировали олигомеры существенно меньших размеров, чем белки дикого типа. Сравнение олигомерной структуры N- и С- концевых химер с общим типом линкера показало, что N-концевые химеры в наибольшей степени

отличаются от белков дикого типа. В то же время автор не выявил существенного влияния состава линкерной последовательности на четвертичную структуру химеры и предположил, что на свойства химеры влияет в большей степени длина линкера. Ясно, что целью создания химерных структур является получение белков, наименее отличающихся по свойствам от белков дикого типа, и автор указывает на необходимость дальнейшего изучения химерных белков с разной длиной линкерной последовательности.

Следующий подраздел посвящен описанию гетероолигомерных комплексов малых белков теплового шока и их химер. Автор впервые показал, что большинство N- и C-концевых химер с общим типом линкера способны взаимодействовать с соответствующими белками дикого типа, однако гетероолигомеры, содержащие в своем составе разные субъединицы, отличаются по своему строению. Это ограничивает использование таких химерных белков в живых клетках, однако флуоресцентные химеры можно использовать для изучения кинетики обмена субъединиц и белок-белковых взаимодействий.

В последнем подразделе представлены данные о шапероноподобной активности химерных белков с использованием модельных белков-субстратов. C-концевые химерные белки обладали пониженной шапероноподобной активностью, а в некоторых случаях даже способствовали агрегации исследуемого субстрата. Автор высказывает предположение, что причиной снижения шапероноподобной активности и склонности C-концевых химер к агрегации является структура самого C-концевого домена, содержащего консервативный гидрофобный I-X-I мотив, обеспечивающий взаимодействие с кристаллиновым доменом. Кроме того, шапероноподобная активность sHsp может зависеть от природы входящего в состав химеры флуоресцентного белка, несмотря на небольшие различия в аминокислотной последовательности ECFP и EYFP. Выводы работы сформулированы четко и подкреплены большим количеством экспериментального материала.

Следует отметить, что исследования проведены на высоком методическом уровне с использованием сложных молекулярно-генетических подходов. Для изучения свойств химерных белков автор

применяет спектральные методы, метод гель-фильтрации, FRET, электронную микроскопию.

Автореферат написан понятным языком. Существенных замечаний и критики по представленным в работе результатам и их описанию не возникает. В качестве единственного замечания можно отметить отсутствие в автореферате пространственных изображений флуоресцентных химер. Высказанное замечание ни в коем случае не снижает хорошего впечатления от работы. Исследование является приоритетным и заслуживает самой высокой оценки.

Диссертационная работа полностью соответствует критериям, установленным пунктом 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидат биологических наук, а ее автор, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.01.04 – биохимия.

Заведующий Лабораторией молекулярных  
основ клеточной подвижности  
Института цитологии РАН,  
доктор биологических наук, профессор

Юрий Сергеевич Боровиков

Старший научный сотрудник Лаборатории  
молекулярных основ клеточной подвижности  
Института цитологии РАН  
кандидат биологических наук

Ольга Евгеньевна Карпичева

Контактные данные организации: 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4  
Тел. 8-812-2973798, E-mail: borovikov@incras.ru



на автореферат диссертации Дацкевича Петра Николаевича «**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ХИМЕР МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА ЧЕЛОВЕКА**», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

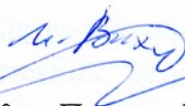
Малые белки теплового шока (sHsp) – большая и гетерогенная группа, объединяющая в своем составе белки с молекулярными массами от 12 до 43 кДа. Интерес к sHsp в последние годы неуклонно растет, что обусловлено участием этих белков в регуляции ключевых процессов жизнедеятельности, в частности, в поддержании белкового гомеостаза за счет предотвращения накопления агрегатов неправильно свернутых или частично денатурированных белков. Одним из подходов, применяемых для изучения sHsp, является создание химер малых белков теплового шока и флуоресцентных белков. Однако, несмотря на широкое использование флуоресцентных химер sHsp, подробных исследований их структуры и свойств не проводилось. Актуальность данного исследования, цель которого заключалась в анализе структуры и свойств различных типов химерных флуоресцентных белков, состоящих из малых белков теплового шока человека HspB1, HspB5, HspB6, HspB8 и флуоресцентных белков ECFP или EYFP, не вызывает сомнения. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи. (1) Получить молекулярно-генетические конструкторы, несущие кДНК химерных флуоресцентных белков, отличающихся по составу, комбинации частей химеры и длине и природе линкера; (2) Разработать методику выделения химерных флуоресцентных белков и получить их в гомогенном состоянии; (3) Исследовать четвертичную структуру флуоресцентных химер sHsp; (4) Проанализировать взаимодействие химерных белков между собой и белками дикого типа, их способность обмениваться субъединицами и формировать гетероолигомерные комплексы; (5) Исследовать шапероноподобную активность химерных белков; (6) Изучить влияние состава и длины линкерных последовательностей на свойства химерных белков. Все задачи, поставленные в исследовании, решены. Среди приоритетных результатов работы необходимо отметить следующие. (1) разработан метод экспрессии и выделения флуоресцентных химер sHsp; (2) Прикрепление флуоресцентного белка как к N-, так и к C-концу малых белков теплового шока, склонных к образованию крупных олигомеров (HspB1, HspB5), приводит к дестабилизации их четвертичной структуры и образованию олигомеров, содержащих меньшее число субъединиц, чем соответствующие белки дикого типа. Прикрепление флуоресцентного белка к малым белкам теплового шока, способным образовывать только небольшие олигомеры (HspB6, HspB8), не сопровождается существенным изменением их четвертичной структуры; (3) С использованием модельных белков-субстратов исследована шапероноподобная активность химерных белков. Установлено, что шапероноподобная активность зависит как от локализации флуоресцентного белка (на N- или C-конце малых белков теплового шока), так и от природы флуоресцентного белка (ECFP или EYFP). В частности, показано, что наибольшей шапероноподобной активностью обладают N-концевые химеры; (4) Исследованы взаимодействия химерных белков с различными sHsp дикого типа. По изменениям анизотропии флуоресценции химерных белков рассчитаны кажущиеся константы скорости обмена субъединиц различных малых белков теплового шока человека. Продemonстрирована возможность использования флуоресцентных химер для выявления

белок-белковых взаимодействий *in vitro* и измерения скорости обмена субъединиц в гетероолигомерных комплексах.

На основании проведенных исследований структуры и свойств 14 химерных sHsp, различающихся как по типу присоединенного флуоресцентного белка и его локализации, так и по составу и длине линкерной последовательности, были сформулированы рекомендации для получения флуоресцентных химер, в наименьшей степени отличающихся от белков дикого типа. Оптимальным представляется использование химер, содержащих флуоресцентный белок, прикрепленный к N-концу малых белков теплового шока длинным гибким линкером.

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследований доложены на международных и российских конференциях. Знакомство с авторефератом диссертации свидетельствует о том, что диссертационная работа Дацкевича П.Н. «Исследование структуры и свойств флуоресцентных химер малых белков теплового шока человека» представляет собой оригинальный научный труд, выполненный на высоком методическом уровне. Работа соответствует всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, а её автор Дацкевич Петр Николаевич, несомненно, заслуживает присуждения ему искомой степени.

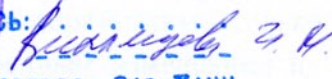
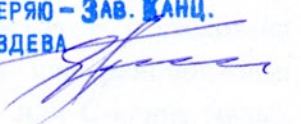
Ведущий научный сотрудник  
лаборатории Структуры и функций  
мышечных белков Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики  
Российской академии наук (ИТЭБ РАН)  
доктор биологических наук



Иван Милентьевич Вихлянцев

Контактные данные организации: 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3  
Тел. (495) 632-78-69. E-mail: [Vikhlyantsev@mail.iteb.ru](mailto:Vikhlyantsev@mail.iteb.ru)



Подпись:   
Удостоверяю – Зав. Канц.  
Е. П. ГРУЗДЕВА 

## О Т З Ы В

на автореферат диссертации Дацкевича Петра Николаевича «Исследование структуры и свойств флуоресцентных химер малых белков теплового шока человека» на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Малые белки теплового шока (sHsp) в последние десятилетия привлекают пристальное внимание многих исследователей, что объясняется участием этих белков в регуляции ключевых процессов жизнедеятельности, а также тем, что имеется связь между sHsp со многими заболеваниями, такими, как различные виды миопатий и невропатий, онкологические заболевания, болезни Альцгеймера, Паркинсона и многие другие. Одним из подходов, применяемых для изучения этих белков, является создание химер малых белков теплового шока и флуоресцентных белков. Использование химер представляет уникальную возможность для изучения свойств sHsp непосредственно в живых клетках. Целью диссертационной работы П.Н. Дацкевича было создание и изучение свойств флуоресцентных химер HspB1, HspB5, HspB6, HspB8 и флуоресцентных белков ECFP или EYFP и сравнение их свойств со свойствами белков дикого типа, что несомненно является актуальной задачей, учитывая совершенно недостаточную изученность таких химер физико-химическими методами.

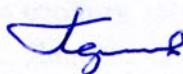
Диссертантом была разработана эффективная методика экспрессии и выделения флуоресцентных химер sHsp. Проанализированы свойства 14 различных флуоресцентных химер sHsp человека. Для этого диссертант умело применил широкий набор физико-химических методов, включая методы хроматографии, динамического рассеяния света, методы флуоресцентной спектроскопии и переноса энергии возбуждения, методы электронной микроскопии. Это позволило ему получить надежные экспериментальные данные.

Диссертантом обнаружено, что присоединение флуоресцентного белка к малым белкам теплового шока человека оказывает заметное влияние на их свойства, что важно учитывать при их использовании в дальнейших исследованиях. Тем не менее, флуоресцентные химеры все-таки могут быть использованы для изучения белок-белковых взаимодействий *in vitro*. Убедительно показано, что четвертичная структура, склонность к агрегации и шапероноподобная активность химерных sHsp существенно зависят от локализации флуоресцентного белка в составе химеры. Показано, что флуоресцентные химеры способны образовывать гетероолигомерные комплексы, размеры которых отличаются от размеров комплексов, образуемых белками дикого типа, но при этом сохраняют специфичность взаимодействий, характерную для белков дикого типа. Диссертантом сформулированы важные рекомендации по созданию флуоресцентных химер, свойства которых будут в наименьшей степени отличаться от sHsp дикого типа.

Сформулированные автором пять выводов и четыре положения, выносимые на защиту, полностью обоснованы. Вся работа П.Н. Дацкевича выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. Результаты работы отражены в четырех статьях в международных научных журналах с высоким импакт-фактором.

Таким образом, по объему приведенных в автореферате диссертации надежных экспериментальных результатов и по их научной значимости работа П.Н. Дацкевича полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Директор института ИБП РАН,  
Заведующий лабораторией  
Новых методов в биологии  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт биологического приборостроения  
с опытным производством РАН  
доктор биологических наук, профессор



Пермяков Евгений Анатольевич

Контактные данные организации: 142290, Московская область, г. Пущино, ул.  
Институтская, д. 7, ИБП РАН, тел. 7 (495) 624-5749. E-mail: epermyak@yandex.ru

Подпись *Пермякова Е. А.*  
удостоверено  
Зав. отг. кадров



*Л. Н. Левченко*

**Отзыв на автореферат диссертации Петра Николаевича Дацкевича на тему  
«ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ХИМЕР  
МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА ЧЕЛОВЕКА», представленной  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

Диссертация П. Н. Дацкевича посвящена исследованию структуры и свойств флуоресцентных химер малых белков теплового шока человека. Малые белки теплового шока – это семейство белков, содержащих высококонсервативный  $\alpha$ -кристаллиновый домен и способных к димеризации. Основными биохимическими функциями малых белков теплового шока считаются способность стабилизировать цитоскелет и шапероноподобная активность. Также некоторые представители семейства sHsp (HSPB1) обладают антиапоптотическими свойствами, подавляя выход цитохрома C из митохондрий. Пристальное внимание исследователей к малым белкам теплового шока в последние годы связано с их способностью подавлять образование белковых агрегатов, играющих ключевую роль в патогенезе конформационных болезней, таких как болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, спинномозжечковая атаксия 3-го типа, амиотрофический боковой склероз и т.п. Для конформационных болезней характерно накопление нерастворимых белковых агрегатов в отдельных типах клеток, приводящее к их гибели. Из литературы известно, что повышенная экспрессия малых белков теплового шока предотвращает образование агрегатов белков, как содержащих полиглутаминовые тракты (показано для HSPB6,  $\alpha$ HSP/HSPB7, HSPB8, HSPB9), так и лишенных их (HSPB5). Таким образом, малые белки теплового шока представляют собой перспективную мишень для терапии конформационных болезней человека. Однако многие аспекты функционирования sHSP в клетках остаются малоизученными, и возможные последствия гиперэкспрессии некоторых малых белков теплового шока – как минимум противоречивыми. Так, для многих типов опухолей характерна повышенная экспрессия HSPB1 (van Heijst et al., 2006), а обнаружение аутоантител к этому белку – благоприятный прогностический признак у пациентов с раком молочной железы (Congro et al., 1998).

Изучение белок-белковых взаимодействий – сложная экспериментальная задача, в каждом конкретном случае требующая нетривиального подхода к работе. Одним из наиболее плодотворных современных подходов к решению такого рода задач является создание химерных белков слияния, несущих в своем составе флуоресцентные белки (GFP, YFP, eYFP, eCFP и др.). Использование таких флуоресцентных химер позволяет не только зафиксировать факт взаимодействия между исследуемыми белками в искусственной экспериментальной системе, но и изучить это взаимодействие *ex vivo* после трансфекции клеток соответствующими векторами. Данный подход опирается на явление флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) между донором и акцептором флуоресценции, находящихся на расстоянии от 2 до 6 нм. В качестве донора и акцептора могут выступать флуоресцентные белки, совместимые по своим характеристикам (например, eYFP и eCFP). Внедрение технологии FRET в экспериментальную практику – важнейший методологический прорыв в современной клеточной биологии.

Самым острым вопросом в использовании флуоресцентных химер является возможное нарушение структуры исследуемых белков, влекущее за собой потерю свойств и, как следствие, неадекватность полученной экспериментальной системы в целом. Поэтому ключевыми этапами являются дизайн и биохимическая характеристика полученных флуоресцентных химер. Особенно это важно для белков, чья молекулярная масса меньше или равна молекулярной массе присоединяемого флуоресцентного белка

Несмотря на то, что флуоресцентные химеры малых белков теплового шока были впервые получены в 2002-2006 гг., подробных исследований влияния присоединения флуоресцентных белков к sHSP ранее не проводилось. Автором впервые получены 14 флуоресцентных химер белков HspB1, HspB6, HspB8 и eCFP или eYFP, отличающихся по составу, комбинации частей химеры и длине и природе линкера, исследованы их четвертичная структура и шапероноподобная активность. Автором установлено, что шапероноподобная активность сильно зависит от локализации и природы флуоресцентного белка, сформулированы рекомендации для получения флуоресцентных химер наименее отличающихся от нативных sHSP и разработан протокол их выделения и очистки.

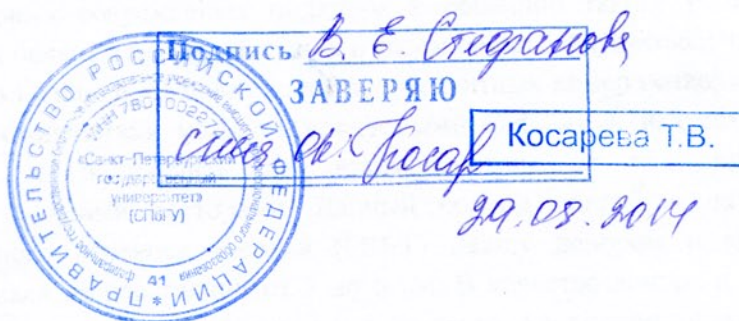
Безусловно, диссертационная работа П. Н. Дацкевича восполняет существенный пробел в методологии создания флуоресцентных химер такого непростого для изучения объекта, как малые белки теплового шока, и ее результаты могут быть полезны при планировании экспериментов как биохимикам, занимающимся молекулярными основами белкового гомеостаза, так специалистам по биологии клетки.

Знакомство с авторефератом позволяет сделать заключение о том, что диссертация П. Н. Дацкевича по актуальности темы, новизне и практической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 03.01.04 – биохимия, а автор заслуживает присуждения искомой степени.

Заведующий кафедрой биохимии  
биологического факультета  
Санкт-Петербургского государственного университета  
кандидат биологических наук, доцент

Василий Евгеньевич Стефанов

Контактные данные организации: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9  
Тел./факс: +7(812) 328-08-52. E-mail: v.stefanov@spbu.ru



## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Петра Николаевича Дацкевича «Исследование структуры и свойств флуоресцентных химер малых белков теплового шока человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Для выявления клеточной локализации и функции белков в современных исследованиях широко используются рекомбинантные флуоресцентные белки, конъюгированные с исследуемым белком с помощью генно-инженерных методов. Такие химерные белки описаны как участники множества биологических процессов. При этом вопрос о том, в какой мере флуоресцентная «надстройка» влияет на свойства изучаемого белка, остается в значительной степени открытым. Поэтому диссертационная работа П.Н. Дацкевича, направленная на создание флуоресцентных химер малых белков теплового шока человека и изучение их свойств, актуальна и важна не только для выявления функциональных свойств малых белков теплового шока, но и как методологический подход к такого рода исследованиям.

В ходе выполнения работы П.Н. Дацкевичем разработана методика экспрессии и выделения флуоресцентных химер малых белков теплового шока, позволяющая получать препаративные количества белка, и проанализированы 14 различных флуоресцентных химер sHsp человека. В частности, исследована олигомерная структура N- и C-концевых химер HspB1, HspB5, HspB6 и HspB8, содержащих желтый флуоресцентный белок EYFP, обнаружена зависимость олигомеризации химер от природы белка теплового шока, и положения флуоресцентной части химеры на N- или C-конце молекулы. Проанализировано взаимодействие химерных белков ECFP-sHsp и EYFP-sHsp, содержащих разные флуоресцентные белки, между собой и с белками дикого типа, их способность обмениваться субъединицами и формировать гетероолигомерные комплексы. Кроме того, исследована шапероноподобная активность химерных белков ECFP-sHsp и EYFP-sHsp и зависимость шаперонной активности от локализации флуоресцентной части химеры на N- или C-конце молекулы. В результате этого обширного исследования установлено, что флуоресцентные химеры способны взаимодействовать с sHsp дикого типа, а также образовывать моноолигомерные и гетероолигомерные комплексы, которые могут отличаться от олигомеров дикого типа по количеству субъединиц, но при этом сохраняют специфичность, характерную для белков дикого типа. Показано также, что шапероноподобная активность флуоресцентных химер малых белков теплового шока зависит от природы флуоресцентного белка, его локализации в составе химеры и от природы малого белка теплового шока и может быть как меньше, так и больше шапероноподобной активности белка дикого типа.

Все эти данные необходимо учитывать при использовании флуоресцентных химер для изучения локализации и функциональных особенностей малых белков теплового шока.

Как все работы, выходящие из этой лаборатории, работа П.Н. Дацкевича отличается ясностью поставленной задачи, четкостью экспериментов и надежностью результатов и выводов. Можно только сожалеть о том, что обилие экспериментального материала, который нужно было «уложить» в небольшой объем автореферата, помешало автору более подробно остановиться на описании тех методов, которые были использованы для анализа химерных белков. Непонятно, например, зачем на рис.4 представлены не профили элюции, а зависимости объема элюции от количества нанесенного белка. Из автореферата трудно понять, каким образом по измерению анизотропии флуоресценции можно детектировать резонансный перенос энергии между флуорофорами одинаковой природы (гомо-FRET), хотя это ясно объясняется в соответствующей статье автора.

В целом, работа П.Н. Дацкевича является профессиональным исследованием, которое характеризует автора как специалиста в области биохимии, владеющего широким арсеналом биохимических, генно-инженерных и физических подходов и методов. Результаты проведенного автором исследования чрезвычайно важны для понимания необходимости биохимической характеристики флуоресцентных белков-химер для интерпретации данных, полученных с их помощью в экспериментах на клетках.

Таким образом, по актуальности темы, научному уровню, объему и качеству выполненной экспериментальной работы, а также по научному и практическому значению полученных в работе результатов диссертационная работа П.Н. Дацкевича соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Ведущий научный сотрудник  
Отдела клеточных культур Института Цитологии РАН,  
доктор биологических наук,

  
София Юрьевна Хайтлина

Контактные данные организации: 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4  
Тел. 8-812-2971829, E-mail: Sofia Khaitlina [skhspb@gmail.com]

