

ОТЗЫВ

официального оппонента Гривенникова Игоря Анатольевича на диссертацию СЛУЧАНКО Николая Николаевича на тему «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04- Биохимия

Актуальность избранной темы.

Взаимодействие различных молекул в клетке определяют ее жизнеспособность и нормальное функционирование. Это в полной мере относится и к белок-белковым взаимодействиям (ББВ), лежащим в основе подавляющего числа жизненноважных процессов на молекулярном уровне. Нормальное функционирование живой клетки сложно себе представить без скоординированной системы взаимодействий с участием белков. Определение прочности, селективности и механизма конкретных ББВ составляет одну из ключевых задач современной биохимии и молекулярной биологии. Решение этой важной фундаментальной задачи также позволяет получать знания, необходимые для разработки лекарственных препаратов для людей с различными патологиями, а потому имеет чрезвычайную актуальность. Крайне важным свойством многих ББВ является их регулируемость, за счет чего белковые комплексы возникают только в ответ на определенный сигнал и могут контролируемо диссоциировать, будучи не востребуемыми. Одним из эффективных механизмов регуляции ББВ является фосфорилирование – катализируемый ферментами-протеинкиназами перенос фосфорильной группы с молекулы АТФ на остатки серина и треонина в составе белка-мишени, в результате чего меняются его свойства и узнаваемость другими белками. Дефосфорилирование белковых молекул под действием фосфатаз обеспечивает обратимость такой регуляции.

Белки так называемого семейства 14-3-3 широко распространены у эукариот и являются универсальными белками-регуляторами, которые селективно узнают белки-партнеры, фосфорилированные по остаткам серина или треонина в определенных последовательностях. Известно, что фосфопептид-связывающая

функция 14-3-3 основана на их димерной структуре, однако фосфорилирование самих 14-3-3 также может регулировать их олигомерное состояние и функции. Связываясь с фосфорилированными белками-партнерами и влияя на их ферментативную активность, внутриклеточную локализацию или взаимодействие с другими белками, 14-3-3 участвуют в регуляции апоптоза, клеточного деления, функционирования транскрипционных факторов, продукции гормонов. Недавно была описана шапероно-подобная функция 14-3-3, которая заключается в предотвращении агрегации других белков, что актуально при развитии ряда так называемых «конформационных» болезней, например болезни Альцгеймера и Паркинсона. В связи с полифункциональностью, белки семейства 14-3-3 и их комплексы являются потенциальной мишенью для разработки лекарств при ряде серьезных патологий, включая нарушения работы гладкой мускулатуры, муковисцидоз, а также нейродегенеративные и онкологические заболевания. Ключом к коррекции этих патологий может стать определение молекулярных механизмов образования пространственных структур комплексов с участием 14-3-3. Однако, среди сотен экспериментально подтвержденных, физиологически значимых взаимодействий с участием 14-3-3 комплексы с установленной структурой исчисляются единицами. Структурные исследования серьезно осложняются необходимостью получения стехиометрически фосфорилированных белков-партнеров 14-3-3 и наличием в них протяженных разупорядоченных участков. Несмотря на долгую историю с момента открытия белков 14-3-3, многие аспекты их функционирования остаются исследованными лишь поверхностно.

В свете этого диссертационная работа Н. Н. Случанко, посвященная исследованию молекулярных механизмов взаимодействия белков 14-3-3 с фосфорилированными белками-партнерами, процессам их димеризации, а также и их шапероно-подобной активности является безусловно актуальной и востребованной в настоящее время.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех основных глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования» и «Результаты и обсуждение»), а также заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 336 страницах и содержит 122

рисунка, 30 таблиц и 678 источников литературы Российских и зарубежных авторов.

Глава «Введение» посвящена описанию состояния проблемы, обоснованию актуальности диссертационного исследования, постановке цели и задач работы. В этой главе также описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и сформулированы положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы» Н.Н. Случанко сначала рассматривает Роль белковых модулей, структурной разупорядоченности и посттрансляционных модификаций в белок-белковых взаимодействиях. Затем автор переходит к описанию исследований белков семейства 14-3-3. Последовательно рассмотрены: изоформы и филогения этих белков, распространение их в тканях человека, пространственная структура белков 14-3-3, их взаимодействие с фосфопептидами и с белками-партнерами. Особое внимание уделено многофункциональности этих белков, их интерактому и регуляции их функционирования. Затем Н.Н. Случанко описывает малый белок теплового шока HSPB6, который является важным партнером белков 14-3-3. Автор отмечает, что до начала этой работы в литературе отсутствовало понимание структурных основ взаимодействия фосфопептидов HSPB6 и, тем более, полноразмерного HSPB6 с белками 14-3-3, что и потребовало тщательного изучения. Обзор написан достаточно подробно, с привлечением большого количества источников литературы последних лет хорошо и доходчиво иллюстрирован. Чувствуется, что автор хорошо знаком с проблематикой, которой посвящена диссертационная работа.

В главе «Материалы и методы» автор подробно описывает схемы и протоколы проведенных экспериментов. Работа выполнена с привлечением самых современных методов молекулярной биологии (клонирование, сайт-направленный мутагенез), микробиологии (культивирование прокариотических микроорганизмов), биохимии (различные виды гель-электрофореза и хроматографии, энзиматическая модификация рекомбинантных белков –

фосфорилирование, дефосфорилирование и ограниченный протеолиз), биофизики (абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, поляризация флуоресценции, круговой дихроизм, динамическое светорассеяние, аналитическое ультрацентрифугирование, дифференциальная сканирующая калориметрия и изотермическая калориметрия титрования), а также структурной биологии (малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, монокристаллическая рентгеновская кристаллография). Все белки, используемые в работе, были получены автором при их суперэкспрессии в клетках *Escherichia coli* и очищены с помощью комбинации хроматографических методов.

Описанные и примененные автором методы успешно дополняют друг друга, а их использование позволило, на мой взгляд, решить поставленные в работе задачи.

В главе «Результаты и обсуждение» диссертант подробно излагает результаты проведенной работы и дает их критический анализ. Результаты изложены последовательно с использованием схем, таблиц и рисунков. Большое количество иллюстративного материала помогает оценить качество полученных результатов. Обсуждение результатов экспериментов построены логично, на основе собственных данных и данных других исследователей. В целом глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех больших разделов:

3.1. Молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с малым белком теплового шока HSPB6.

3.2. Разработка и применение методов, облегчающих структурные исследования комплексов 14-3-3.

3.3. Мономеризация и шапероно-подобная активность 14-3-3.

Основные полученные результаты и их оригинальность.

Н.Н. Случанко разработано несколько оригинальных подходов для быстрой и удобной экспрессии и дальнейшей очистки фосфорилированных белков и комплексов семейства 14-3-3, облегчающих структурные исследования, в том числе в высокопоточном формате, который особенно востребован при интерактивных исследованиях. Автором с привлечением разнообразных методов биохимии, биофизики, молекулярной и структурной биологии было проведено

структурно-функциональное исследование, в результате которого установлен молекулярный механизм взаимодействия представителей семейства 14-3-3 с белком HSPB6, участвующим в регуляции расслабления гладких мышц бронхов и сосудов. Впервые определены пространственные структуры комплекса 14-3-3 с полноразмерным белком HSPB6 и его фрагментами, что позволило выявить ключевые молекулярные последовательности, привлекательные с точки зрения подбора малых молекул с терапевтическим потенциалом. Комплексный подход к изучению взаимодействия между белками 14-3-3 и HSPB6 показал его полную состоятельность для получения структурной информации, несмотря на сложности, связанные с необходимостью стехиометрического сайт-специфического фосфорилирования и наличием протяженных неструктурированных элементов в выбранном белке-партнере 14-3-3. Автором продемонстрирована применимость разработанного подхода, основанного на химерах 14-3-3 с фосфопептидами белков-партнеров, для решения структур физиологически значимых комплексов, перспективных с точки зрения разработки лекарств. Получены первые структуры комплексов 14-3-3 с фосфорилированными фрагментами стероидогенного регуляторного белка STARD1 и онкобелка E6 вируса папилломы человека. В случае E6 не только впервые установлены две структуры 14-3-3 с фосфорилированным С-концевым мотивом вида pS/pTXX-COON, но и показана селективность действия широко известного стабилизатора таких взаимодействий фузикокина. В отличие от большинства описанных случаев стабилизации комплексов 14-3-3, в случае комплексов 14-3-3/E6 фузикокин оказывал умеренное ингибирующее действие, связываясь в амфипатической бороздке 14-3-3 одновременно с фосфопептидами E6 с образованием тройного комплекса, который автору удалось закристаллизовать. С учетом высокого пространственного разрешения, эти структурные данные могут помочь, как отмечает диссертант, в разработке как ингибиторов, так и стабилизаторов взаимодействия 14-3-3 с E6 и белками других вирусов, имеющих соответствующие мотивы, что представляет значительный интерес в развитии подходов к борьбе с целым рядом вирусных инфекций. С помощью сайт-направленного мутагенеза автором получена модель мономерной формы белка 14-3-3 зетта, детально исследованы ее структурные и функциональные свойства.

Проведен сравнительный анализ свойств мономеров и димеров белков 14-3-3, а также впервые получена модель структуры мономеров 14-3-3 в растворе. Обнаруженные отличительные свойства мономеров 14-3-3 (повышенная гидрофобность и склонность к структурной разупорядоченности, скрытая в последовательности N-концевой области 14-3-3) позволили Н.Н. Случанко сначала предположить, а затем и доказать наличие у мономеров 14-3-3 антиагрегационной активности по отношению к нескольким модельным белкам-субстратам с различным механизмом агрегации. Полученные данные позволили автору впервые соотнести структурные особенности 14-3-3 с их антиагрегационной активностью, а также предложить механизм, объясняющий наличие антиагрегационной активности у димеров 14-3-3 за счет частичного экспонирования межсубъединичного интерфейса. Таким образом, обнаруженная диссертантом склонность к структурной разупорядоченности 14-3-3, скрытая в их N-концевой области, может проявляться при мономеризации белка, при обмене субъединицами с образованием различных гетеродимеров 14-3-3, а также при функционировании этих белков как шаперонов.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений, поскольку они базируются на достаточном объеме экспериментального материала. Достоверность результатов подтверждается также их воспроизводимостью и использованием современных методов исследования и статистической обработки: на всех этапах применялись современные способы получения репрезентативных данных.

В главе «Заключение» Автор анализирует и суммирует полученные результаты и на их основании предлагает дальнейшие пути исследований.

Теоретическая и практическая значимость настоящей работы.

Н.Н. Случанко проведено комплексное структурно-функциональное исследование, в результате которого впервые установлен молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с белком HSPB6, участвующим в регуляции расслабления гладких мышц бронхов и сосудов. Впервые определены пространственные структуры комплекса 14-3-3 с полноразмерным белком HSPB6 и его фрагментами. Это позволило выявить ключевые молекулярные последовательности, которые

привлекательны с точки зрения подбора низкомолекулярных модуляторов, обладающих потенциальным терапевтическим потенциалом при ряде патологий. Автору удалось получить мономерную форму белка 14-3-3, и исследовать ее структуру и физико-химические свойства, в сравнении с димерным белком дикого типа. В структуре 14-3-3 были локализованы области, участвующие в его шапероно-подобной активности. Также было разработано несколько подходов для более быстрого и удобного получения фосфорилированных белков и их комплексов с 14-3-3, облегчающих структурные исследования. Продемонстрирована применимость подхода, основанного на использовании химерных молекул 14-3-3 с фосфопептидами, для решения структурно-физиологически значимых комплексов, перспективных с точки зрения разработки лекарств, в том числе получены первые структуры комплексов 14-3-3 с фосфорилированными фрагментами стероидогенного регуляторного белка STARD1 и онкобелка E6 вируса папилломы человека. С учетом высокого разрешения, эти структурные данные могут помочь в развитии подходов к лечению папилломавирусных инфекций в будущем.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется. В списке цитированной литературы я рекомендовал бы автору приводить полное обозначение последних страниц публикаций.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Основные результаты диссертации опубликованы в виде 20 статей в международных рецензируемых журналах и одной главе в книге, входящих в перечень ВАК. Результаты исследования были представлены в виде стендовых и устных докладов (более 10) на международных и Российских конгрессах и конференциях.

Заключение.

Диссертационная работа Случанко Николая Николаевича на тему **«Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3»**

является самостоятельной, завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи современной биохимии, посвященной белок-белковым взаимодействиям 14-3-3 семейства с другими представителями белков эукариотической клетки. По актуальности темы, методологическому подходу, объему выполненных диссертантом исследований, новизне полученных данных, их научно-практической значимости, опубликованным результатам, диссертационная работа Случанко Н.Н. полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04- Биохимия.

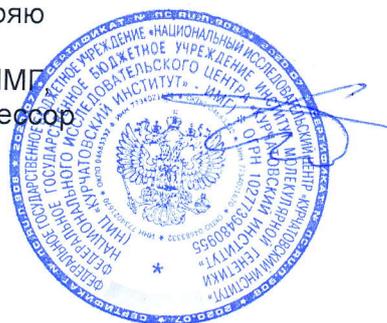
доктор биологических наук, профессор,
заведующий Лабораторией молекулярной
генетики соматических клеток
НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ

Гривенников Игорь Анатольевич

123182, г. Москва, пл. ак. Курчатова, д.2, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ) тел.: 8499-1960014, e-mail: grivigan@mail.ru

Шифр и наименование специальности, по которой защищена докторская диссертация: 03.00.03 – молекулярная биология; 14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология.

Подпись Гривенникова И.А. заверяю
заместитель директора
НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ
доктор биологических наук, профессор



П.А. Сломинский

« 25 » января 2021 г.