

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертацию **СЛУЧАНКО Николая Николаевича «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3»**, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия

**Актуальность темы исследования.** Белок-белковые взаимодействия (ББВ) составляют физическую основу существования клетки, определяют ее жизнеспособность и нормальное функционирование, лежат в основе ферментативного катализа и метаболических путей. В каждой клетке реализуются десятки тысяч ББВ. Последние годы характерны, с одной стороны, углублением и детализацией наших знаний о том или ином типе ББВ, и, с другой стороны, попыткам систематизировать эти знания, что выражается в создании соответствующих баз данных и все более совершенных моделей ББВ. Естественно, что каждый крупный цикл исследований в этой области вызывает большой интерес. Диссертационная работа Н.Н. Случанко принадлежит к числу таких исследований. Работа посвящена изучению ББВ с участием регуляторных белков семейства 14-3-3, распространенного среди большинства эукариотических организмов. Белки 14-3-3 избирательно узнают белки-партнеры, фосфорилированные по остаткам серина или треонина в определенных аминокислотных последовательностях. Многие комплексы с участием 14-3-3 вовлечены в регуляцию апоптоза, клеточного деления, работы ионных каналов, цитоскелетных белков, транскрипционных факторов, продукции гормонов. В последнее время сообщается также об участии комплексов 14-3-3 в развитии ряда инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии, а также так называемых «конформационных болезней», в частности, болезней Альцгеймера и Паркинсона. Исследования механизмов, лежащих в основе ББВ и структуры соответствующих комплексов в ряде случаев позволяют разрабатывать новые терапевтические подходы, создавать новые, более эффективные лекарственные препараты. В этой связи работа Н.Н. Случанко является чрезвычайно актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

**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.

**Глава «Введение»** кратко описывает состояние фундаментальной проблемы и обосновывает актуальность и целесообразность диссертационной работы. Продемонстрирована научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и сформулированы положения, выносимые на защиту.

**В «Обзоре литературы»** диссертант достаточно подробно рассматривает особенности структурной организации и регуляции белков 14-3-3, изоформенный состав, филогению и распространение белков 14-3-3, а также многообразие их белков-партнеров, включая необходимые сведения о малом белке теплового шока HSPB6, который является важным партнером белков 14-3-3 в регуляции сократительной активности гладких мышц. Подчеркивается, что до начала работы Н.Н. Случанко в литературе отсутствовало понимание структурных основ взаимодействия фосфопептидов HSPB6 и, тем более, полноразмерного HSPB6 с белками 14-3-3, что требовало внимательного изучения. При прочтении обзора создается впечатление, что диссертант свободно владеет тематикой исследования и прекрасно представляет современный уровень исследований в выбранной области.

**В главе «Материалы и методы»** диссертант детально описывает использованные реактивы и препараты, а также методические подходы для решения поставленных в работе задач. Хотелось бы отметить, что методическая основа данной работы может служить примером масштабного исследования в области биохимии. Для достижения цели и задач работы автор использует самый широкий арсенал методов; наряду с «классическими» биохимическими подходами широко используются современные экспериментальные методы генетической инженерии, биофизики и структурной биологии. Хотелось бы отметить также тщательное описание использованных методик - приведены все детали, необходимые для воспроизведения поставленных экспериментов и подтверждения полученных результатов. Описанные диссертантом методы адекватны поставленным задачам и позволили успешно их решить.

**В главе «Результаты и обсуждение»** изложены результаты поставленных экспериментов и проведен их анализ с учетом данных литературы. Результаты изложены в

логичном порядке и наглядно проиллюстрированы многочисленными цветными рисунками и емкими таблицами, что способствует восприятию сложного материала и позволяет оценить большой объем проделанной работы. Стоит отметить доскональный подход автора к своим исследованиям и критическому сравнению полученных результатов с данными других авторов, а также особое внимание, которое диссертант уделяет переходам между подразделами.

**В «Заключении»** Случанко Н.Н. обобщает и суммирует полученные результаты и очерчивает перспективы дальнейших исследований.

**Оригинальность, теоретическая и практическая значимость полученных результатов.** Н.Н. Случанко разработаны оригинальные подходы, облегчающие получение и исследование фосфорилированных белков и их комплексов с белками 14-3-3. Проведено комплексное структурно-функциональное исследование взаимодействия белков 14-3-3 с фосфорилированным белком HSPB6, участвующим в регуляции расслабления гладких мышц бронхов и сосудов, что позволило предложить механизм образования этого важного регуляторного комплекса и выявить факторы, влияющие на его стабильность. В работе впервые в мире установлены кристаллические структуры комплекса 14-3-3 с полноразмерным белком HSPB6 и его фосфопептидами, что позволило диссертанту построить трехмерную модель регуляторного комплекса и обнаружить ключевые области контакта белков, привлекательные с точки зрения разработки малых молекул с терапевтическим потенциалом, в том числе, предположительно, для регуляции сократительной активности мышц (миорелаксантов).

Работа также чрезвычайно ценна и в методическом аспекте. В качестве примера можно привести разработанную Н.Н. Случанко систему, обеспечивающую ко-экспрессию целевых белков и протеинкиназы А в клетках *E. coli*. Этот подход позволил решить проблему получения белков с высокой степенью фосфорилирования. Особая ценность этой методики состоит в возможности замены компонентов системы и получать фосфобелки разной природы.

Далее Н.Н. Случанко разработал и успешно применил оригинальный подход, основанный на создании химерных белков 14-3-3 с фосфорилированными фрагментами белков-партнеров. Этот подход был сначала опробован на фосфопептидах белка HSPB6, что подтвердило возможность получения структурной информации, эквивалентной

использованию более дорогих синтетических фосфопептидов. Затем уже отработанный подход был успешно применен для того, чтобы впервые определить кристаллические структуры нескольких физиологически значимых комплексов белков 14-3-3 с фрагментами стероидогенного регуляторного белка STARD1, фермента-регулятора циркадных ритмов AANAT, а также онкобелка E6 папилломавируса человека. Для E6 были впервые установлены две структуры 14-3-3 с фосфорилированным С-концевым фрагментом pS/pTXX-COOH и показана возможность модуляции этого взаимодействия с помощью малой молекулы (фузикокина). С учетом наличия pS/pTXX-COOH мотивов в структуре целого ряда белков различных вирусов млекопитающих, полученные автором структурные данные высокого разрешения могут быть полезными при разработке новых терапевтических подходов к борьбе с вирусными инфекциями.

Наконец, диссертант подробно исследовал олигомерное состояние и шапероноподобную активность белка 14-3-3 на примере одной из наиболее распространенных изоформ человека – 14-3-3ζ. Несмотря на то, что 14-3-3 образуют достаточно стабильные димеры, фосфорилирование остатка серина-58 в области димеризации провоцирует их диссоциацию *in vivo*. Автором была разработана мутантная модель мономерной формы белка 14-3-3ζ человека, с помощью которой удалось впервые охарактеризовать уникальные структурные и функциональные особенности мономерной формы 14-3-3. При сравнении свойств димеров и мономеров удалось обнаружить повышенную гидрофобность поверхности мономеров 14-3-3 и склонность к структурной разупорядоченности у N-концевой области 14-3-3. На основе этих данных у мономеров 14-3-3 была предположена и затем продемонстрирована высокая антиагрегационная активность по отношению к нескольким модельным белкам-субстратам с различным механизмом агрегации. Также автор предложил механизм, объясняющий наличие антиагрегационной активности у димеров 14-3-3 за счет частичного экспонирования межсубъединичного интерфейса.

**Достоверность результатов диссертации** не вызывает сомнений, и сформулированные выводы логично следуют из полученных результатов.

**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 более 10 докладов на Российских и международных научных мероприятиях. Публикации и автореферат хорошо отражают содержание диссертации.

**Личный вклад соискателя** в проведенных исследованиях являлся определяющим, о чем свидетельствуют публикации – из 21 опубликованной работы по теме диссертации в 18 диссертант стоит либо на первом, либо на последнем месте. В то время как наличие многих статей в качестве первого автора говорит о большой экспериментальной работе, проведенной непосредственно диссертантом, наличие нескольких статей, где Случанко Н.Н. стоит на последнем месте, говорит о том, что диссертант зарекомендовал себя как успешный руководитель и координатор исследований. Стоит также отметить наличие у Случанко Н.Н. нескольких статей, где он является единственным автором.

Как и всякий печатный труд, диссертационная работа Н.Н. Случанко не лишена некоторых недостатков. Сразу оговорюсь, что все они относятся к оформлению работы и никак не влияют на ее высокую оценку. В тексте диссертации имеется ряд неудачных выражений, дефицит знаков препинания (что, к сожалению, характерно для многих молодых авторов) и т.д. По моему мнению, однако, выискивать огрехи в тексте докторской диссертации представляется мелочным. Хотелось бы высказать два пожелания автору, которые, возможно, он уже и сам имеет в виду для работы в будущем. Мне кажется, что принципы методик ко-экспрессии целевых белков с протеинкиназой А можно было бы расширить и создать соответствующие системы для других посттрансляционных модификаций – метилирования, гликозилирования, ацетилирования и др. При должном развитии возможно создание генерального метода, применимого также и в биотехнологии. Во-вторых, чрезвычайно перспективным на базе полученных результатов представляется разработка прототипов лекарственных препаратов. В диссертации приведены данные по виртуальному скринингу, однако, по моему мнению, уровень полученных знаний уже в ближайшее время позволит перейти к экспериментальному тестированию

В заключении необходимо отметить, что результаты работы Н.Н. Случанко соответствуют последним мировым тенденциям в области исследования белок-белковых взаимодействий и вносят значимый вклад в понимание различных аспектов функционирования белков 14-3-3. Полученные данные безусловно будут способствовать более глубокому пониманию молекулярных механизмов функционирования этих интересных белков, что позволит разрабатывать новые подходы к терапии инфекционных и хронических заболеваний.

**Заключение.** Диссертационная работа Случанко Николая Николаевича «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3» является самостоятельной, завершенной научно-квалификационной работой. По актуальности темы, методологии, объему и новизне экспериментальных данных, их научно-практической значимости, публикациям, 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 химических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений



КОЧЕТКОВ С.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, адрес: 119991 г. Москва, ул. Вавилова, 32, Телефон: 8(499)135-05-90. E-mail: kochetkoffsergej@yandex.ru

Шифр и наименование специальности, по которой была защищена докторская диссертация – 03.01.03 Молекулярная биология.

Подпись Кочеткова С.Н. заверяю...

Ученый секретарь ФГБУН Института  
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

К.В.Н.

Бочаров А.А.



28.01.2021