

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу 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

Основная часть белков клетки вступает в белок-белковые взаимодействия, ряд белков взаимодействует также с нуклеиновыми кислотами, сахарами и липидами. Эти взаимодействия регулируются, в частности посредством посттрансляционных модификаций (ПТМ). Среди ПТМ наиболее изучено фосфорилирование, ацетилирование, метилирование. Классическим примером сборки белковых комплексов в ответ на фосфорилирование тирозина является активация рецепторных тирозиновых киназ, например, EGFR, IR, PDGFR. Рецептор димеризуется и аутофосфорилируется, и затем к остаткам фосфотирозина прикрепляются т.н. адапторные белки или непосредственно сигнал-проводящие белки. Гораздо более распространенным в клетках является фосфорилирование белков по остаткам серина и треонина, составляя, по ряду оценок, более 90% фосфопротеома. Вместе с тем недавние работы в области фосфопротеомики свидетельствуют о том, что список фосфорилируемых в белках аминокислотных остатков может быть значительно шире и включать неканонические His, Asp, Glu, Lys, Arg и Cys (Hardman et al., 2019). Фосфорилирование по этим остаткам в экстрактах клеток человека возможно увидеть, изменив условия обогащения фосфопептидов. В отличие от парадигмы сборки интерактосом на фосфотирозине во многих случаях фосфорилирование по Сер/Тре приводит к разборке белковых комплексов (например, разборка виментиновых промежуточных филаментов, разборка олигомеров малых белков теплового шока, нарушение связывания протеинкиназы КЛЦМ с кальмодулином и др.) или изменению конформации самого белка, что эквивалентно нарушению имевшихся внутрибелковых взаимодействий. В этих случаях объемная отрицательно заряженная фосфатная группа самостоятельно выполняет роль «диспергатора». Однако имеются примеры и фосфосерин / фосфотреонин-индуцированных белок-белковых взаимодействий. Они опосредуются доменами, узнающими определенные контексты, включающие фосфо-Сер /Тре (например, WW, WD40, MH2). Весьма интересным семейством белков, связывающих множество функционально различных фосфобелков, являются белки 14-3-3. Это широко распространенные среди эукариот универсальные регуляторы, имевшие по ходу их открытия и более благозвучные названия (Леонардо, Стратифин, Echo 1 и др.), но в итоге

оставшиеся в цифровом коде. Они обладают высокой эволюционной консервативностью, что свидетельствует о важности выполняемых ими функций. В самом деле, установлено, что белки 14-3-3 вовлечены в базовые процессы жизнеобеспечения клеток, такие как метаболизм, транскрипция, клеточный цикл, апоптоз, экзоцитоз, внутриклеточная сигнализация, динамика цитоскелета и сократительная активность мышц. Белки 14-3-3 ассоциированы с развитием нейродегенеративных и онкологических заболеваний, вероятно, и сердечной недостаточности. Однако во многих случаях молекулярные механизмы участия 14-3-3 в перечисленных процессах и патологиях до конца не исследованы. Не в последнюю очередь это связано с крайне малым объемом знаний о структурных аспектах взаимодействия 14-3-3 с белками-партнерами. Получение таких знаний и попытка на их основе обозначить новые подходы к лекарственной терапии серьезных заболеваний является актуальной научной проблемой, на решение которой диссертант и направил свои усилия.

В работе сформулированы следующие группы экспериментальных задач:

1. Определение молекулярного механизма взаимодействия 14-3-3 с малым белком теплового шока HSPB6 человека, включая установление трехмерной структуры их комплекса.
2. Установление трехмерной структуры комплекса 14-3-3 с фосфопептидами, опосредующими связывание 14-3-3 с другими белками-партнерами.
3. Сравнительные структурно-функциональные исследования мономерной и димерной формы 14-3-3, в том числе, его шапероно-подобной активности.
4. Разработка новых методов для повышения эффективности структурных исследований комплексов 14-3-3 с фосфорилированными белками-партнерами.

В работе применены следующие методы и подходы.

Методы молекулярного клонирования для создания необходимых генетических конструкций 14-3-3, HSPB6 и других белков. Так, было создано 34 конструкции 14-3-3, включая 8 химерных конструкций, в которых к 14-3-3 добавляли последовательности, кодирующие пептиды белков-партнеров 14-3-3, такие как B6, Gli, AANAT и др. Всего в работе было создано более 40 конструкций, с помощью которых методами бактериальной экспрессии были получены соответствующие белки. Очистку белков проводили комбинацией хроматографических методов. Структурно-функциональные свойства

полученных белков и их комплексов исследовали методами нативного и денатурирующего электрофореза. Выполняли ограниченный протеолиз, а также фосфорилирование белков *in vitro* и в бактериальных клетках. Широко применяли биофизические методы, такие как абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, поляризация флуоресценции, круговой дихроизм, динамическое светорассеяние, аналитическое ультрацентрифугирование, дифференциальная сканирующая калориметрия и изотермическая калориметрия титрования. Большая часть работы выполнялась методами структурной биологии (малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, монокристаллическая рентгеновская кристаллография). В рамках диссертации были разработаны новые методические подходы, позволяющие получать стехиометрически фосфорилированные белки и пептиды непосредственно при экспрессии в бактериальных клетках, что существенно ускорило структурные исследования комплексов 14-3-3. Знакомство с методическим разделом диссертационной работы Случанко Н.Н. не оставляет сомнений в том, что автором при решении поставленных задач были использованы современные методические подходы, позволяющие получать достоверные и воспроизводимые результаты.

При выполнении работы автор получил следующие основные результаты.

1. Впервые установлена трехмерная структура полноразмерного малого белка теплового шока HSPB6 в комплексе с 14-3-3 и показана ключевая роль связывания фосфопептида RRApS16APLP HSPB6 в амфипатической бороздке 14-3-3. Установлен механизм образования, прочность и стехиометрия комплекса двух белков. В его структуре идентифицированы участки, пригодные для связывания малых органических молекул-регуляторов взаимодействия 14-3-3 и B6 – возможных лекарственных соединений.
2. Получены первые в мире структуры с атомарным разрешением комплексов 14-3-3 с пептидами нескольких белков-партнеров (Gli, STARD1, AANAT, BAD и E6), с помощью которых они взаимодействуют с 14-3-3. Для этого был разработан оригинальный метод создания химерных конструкций 14-3-3-пептид и их ко-экспрессии с протеинкиназой A.
3. Разработана высокоэффективная система, обеспечивающая ко-экспрессию целевых белков и протеинкиназы A в клетках *E.coli*, позволяющая получать белки / пептиды с высокой степенью фосфорилирования, что критично для их комплексообразования с 14-3-3.
4. Выявлена структурная разупорядоченность N-концевой области, которая важна для димеризации 14-3-3 и установлено, что мономеры 14-3-3 обладают пониженной стабильностью и, одновременно с этим, повышенной гидрофобностью и повышенной

антиагрегационной активностью в отношении некоторых белков-субстратов (инсулин, АДГ, S1 фрагмент миозина).

Научная и практическая ценность результатов

Полученные диссертантом результаты имеют весомое значение для развития крупного направления в биологической науке - регуляции белок-белковых взаимодействий путем фосфорилирования. Установленная им структура HSPB6 в комплексе с 14-3-3 стала первой структурой полноразмерного малого белка теплового шока в функциональном состоянии и второй в мире структурой белок-белкового комплекса 14-3-3. Эти данные, а также разработанные автором методы эффективного получения комплексов 14-3-3 с белками и фосфопептидами обеспечили ускоренное развитие подобных исследований в мире. Полученные автором данные имеют фундаментальный характер и позволяют глубже понять организацию многих регуляторных процессов в клетках, в которых задействовано фосфорилирование, как одна из наиболее распространенных посттрансляционных модификаций белков. Практическая значимость работы выражается в установлении структур комплексов 14-3-3 с высоким разрешением, пригодных для рационального дизайна новых лекарственных препаратов. Не менее важным практическим выходом данной работы следует считать разработанный автором метод высокоэффективного фосфорилирования белков-партнеров 14-3-3 при их ко-экспрессии с протеинкиназой А в клетках бактерий. Этот метод, как и метод создания и фосфорилирования химер 14-3-3 значительно ускорил процесс получения новых данных при изучении комплексообразования 14-3-3 с другими белками. Учитывая, что количество партнеров 14-3-3 исчисляется сотнями, разработанные методы при их применении в высокопоточном формате позволят, существенно сократить время решения этих научных задач и приблизить получение высокоразрешенных структур, которые могут оказаться чрезвычайно важными при разработке нового типа лекарственных препаратов – модуляторов 14-3-3.

Основные замечания и вопросы по сути диссертационной работы следующие.

1. Обзор литературы с. 55. Автор предполагает, что взаимодействие фосфорилированного полноразмерного B6 или его фосфорилированного пептида с 14-3-3 стоит в центре регуляции расслабления гладкой мускулатуры, и расслабление происходит в конечном счете за счет актин-деполимеризующего действия кофилина, активация которого зависит от взаимодействия 14-3-3 и B6. На мой взгляд, «кофилиновая» гипотеза не лучшая для гладких мышц, где практически не происходит деполимеризации актина в отличие от немышечных клеток, для которых такой механизм показан. Возможно,

снижающее мышечную сократимость действие В6 или его фосфопептида, включающего фосфо-Ser16, реализуется в гладких мышцах сходным образом с тем, как это предполагается в сердечной мышце – за счет высвобождения из комплекса с 14-3-3 фосфатазы PP1, которая дефосфорилирует фосфоламбан и стимулирует ингибирование им Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула SERCA2a. В гладких мышцах изоформы SERCA2 также участвуют в транспорте Ca^{2+} , и есть фосфоламбан, правда, его значительно меньше, чем в сердце, и его роль в регуляции гладкомышечного расслабления убедительно не доказана.

2. Материалы и Методы, с. 64. Для улучшения кристаллизации в белке 14-3-3σ были разработаны замены 159KKE161 → AAA, обозначенные Clu1, и 75EEK77 → AAA, обозначенные Clu3, в соответствии с подходом уменьшения поверхностной энтропии (SER). Внесение соответствующих мутаций в кДНК 14-3-3σ позволяет получить кристаллы белка, подходящие для установления структуры с высоким разрешением. Вопрос – насколько такие значимые замены, когда кластер заряженных аминокислотных остатков меняется на кластер незаряженных, нарушает нативную структуру 14-3-3σ? Подтверждали ли структуру альтернативным способом, например, ЯМР-спектроскопией.

3. Рис. 24. В MS/MS спектре пик фосфопептида с массой 1429,7 Да, соответствующего последовательности RApS16APLPGLSAPGR белка HSPB6, находится на пределе обнаружения. Это реальный уровень фосфорилирования В6 или потери фосфата при MALDI десорбции пептида?

4. Могут ли образовываться тройные комплексы из димера 14-3-3 и двух разных фосфобелков, несущих подходящие для взаимодействия фосфопептиды?

5. В системе бактериальной ко-экспрессии белков с РКА удается с высокой стехиометрией фосфорилировать целевой пептид. Однако из-за высокой концентрации киназы под «горячую руку», как выясняется, могут попасть и неконсенсусные остатки (как, например, в спейсере GSGpS, который пришлось в итоге заменить на GGGG). В целевых белках-партнерах 14-3-3 может быть несколько фосфосайтов и еще больше Сер и Тре остатков, которые не фосфорилируются в норме, но не в данной системе. Означает ли это обстоятельство, что необходимо предварительно заменить все потенциально фосфорилируемые остатки в структуре белка кроме одного, чтобы получить приемлемый для связывания фосфопептид? И если этого не сделать, какова вероятность получить на выходе гиперфосфорилированный белок-партнер? Несмотря на завидную эффективность данная система, вероятно, не универсальна, когда дело касается белков, а не пептидов. Есть ли альтернативные подходы к решению задач данного типа?

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа написана в классическом стиле и состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, результатов исследований и обсуждения, заключения, пяти выводов и списка литературы, включающего 678 источников. Объем работы 336 страниц.

Все разделы написаны ясно, логично и не затянуто. Работа содержит много наглядных схем и таблиц, облегчающих восприятие материала читателем, исходно не углубленным в предмет исследования. При ознакомлении с методическим разделом становится очевидно, что диссертант применял адекватные и современные методы исследования, позволяющие получать достоверные и воспроизводимые результаты.

Глава Результаты и обсуждение самая обширная, состоит из подразделов и содержит результаты многочисленных экспериментов, выполненных автором за более чем десятилетний период. Этот раздел также хорошо иллюстрирован, в том числе, многочисленными структурами вариантов 14-3-3 и B6, полученными в ходе рентгеноструктурных исследований. Обсуждение результатов проведено корректно в сопоставлении с данными литературы.

Недостатки в оформлении работы малочисленны. На всю рукопись обнаружилось 3-4 опечатки. На рис. 26Б не удачно подобраны цвета кривых для B6 и pB6, обе кривые черные, что есть что понятно только из текста. Автор не избежал англоязычного научного жаргона типа фьюжн, фитирование, решить структуру.

Высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают ценности и значимости диссертационной работы Н.Н. Случанко.

Сделанные автором выводы представляются корректными. Результаты работы неоднократно доложены на российских и международных конференциях и симпозиумах, по теме работы опубликовано 20 статей в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в международные базы данных Scopus и/или Web of Science Core Collection. Следует особо отметить, что многие из этих статей опубликованы в престижных журналах, входящих в первый квартиль и имеющих высокий импакт-фактор. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

Заключение

Представляемая Случанко Николаем Николаевичем диссертационная работа "Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3" на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»,


несомненно, является оригинальным крупным научным исследованием, выполненным в основном лично автором. В результате проведенных исследований автором сформировано новое научное направление, хорошо описываемое самим названием диссертационной работы. Это направление открыто для дальнейших исследований, и автор создал ряд оригинальных научных инструментов и технологий для более эффективного продвижения в этом направлении. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), и ее автор Н.Н. Случанко заслуживает присвоения ему искомой ученой степени.

Главный научный сотрудник
и.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
Национального медицинского исследовательского
центра кардиологии Минздрава России
доктор биологических наук, профессор
Специальности: 14.00.06 Кардиология, 03.00.04 Биохимия
Ширинский Владимир Павлович
ул. 3-я Черепковская д. 15а, Москва 121552, Россия
эл. почта: shirinsky@gmail.com
тел.: 8495-414-7246



В.П. Ширинский

Подпись д.б.н., профессора В.П. Ширинского заверяю
Ученый секретарь ИЭК НМИЦ кардиологии МЗ РФ
доктор медицинских наук



О.С. Плеханова

02.02.2021