



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*  
Российской академии наук  
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

*22.01.2021 № 4.10-МФ-41*

на № 85-07-07-1132 от 05.11.2020

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук  
академик Габитов А.Г.



«18» января 2021 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Николая Николаевича Случанко «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

Диссертационная работа Случанко Н.Н. посвящена исследованию белок-белковых взаимодействий с участием белков семейства 14-3-3, которые вовлечены в регуляцию различных физиологических процессов в эукариотических клетках, а также связаны с развитием целого ряда патологий. Исследование механизма белок-белковых взаимодействий на молекулярном уровне имеет огромную важность как для фундаментальной науки, так и для решения ряда практических задач, например, при разработке малых молекул с фармакологическим потенциалом.

Белки семейства 14-3-3 селективно узнают белки-партнеры, фосфорилированные по

остаткам серина или треонина в определенных последовательностях. В организме белки 14-3-3 в основном представлены в виде гомо- и гетеродимеров, при этом фосфорилирование остатков Ser в самих белках 14-3-3 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, белки 14-3-3 участвуют в регуляции апоптоза, клеточного деления, функционирования транскрипционных факторов, продукции гормонов и т.д. Недавно была описана шаперон-подобная функция белков 14-3-3, которая заключается в предотвращении агрегации других белков. Это свойство представителей семейства 14-3-3 может играть определенную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, которые сопровождаются агрегацией неправильно свернутых белков, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона. Вовлечение во множество важных процессов в клетке указывает на то, что белки семейства 14-3-3 и их комплексы с белками-партнерами могут выступать в качестве потенциальных мишеней для разработки лекарств для лечения ряда серьезных патологий, включая нарушения работы гладкой мускулатуры, муковисцидоз, а также нейродегенеративные и онкологические заболевания.

Ключом к созданию новых лекарственных препаратов могут стать знания о пространственной структуре и механизме образования комплексов с участием белков 14-3-3. Однако среди сотен экспериментально подтвержденных, физиологически значимых взаимодействий этих белков в настоящее время определены пространственные структуры лишь единичных комплексов. Структурные исследования в этой области серьезно осложняются необходимостью получения селективно фосфорилированных белков-партнеров, а также 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.

Изложенное выше подтверждает большую актуальность тематики и важность задач, поставленных в диссертационной работе Случанко Н.Н., а также оправданный и корректный выбор методов и подходов, использованных для их решения.

### **Структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, трех основных глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования» и «Результаты и обсуждение»), заключения, выводов, приложения и списка литературы, изложена на 336 страницах и содержит 122 рисунка, 30 таблиц и 678 источников литературы. Изложение литературных данных и результатов исследований хорошо структурировано, подразделы отражают порядок проведения



исследований и логически связаны друг с другом. Особенно следует отметить тщательную подготовку схем и рисунков, которые исчерпывающе иллюстрируют практически все проведенные эксперименты и результаты работы.

В работе поставлено пять крупных задач, по которым сформулировано восемь более детализированных положений, выносимых на защиту, полностью отражающих эти задачи. По результатам диссертационной работы сделано заключение и сформулировано пять выводов, которые являются правомерными и соответствуют цели и задачам исследования. Выводы подтверждаются результатами работы и являются научно обоснованными и практически значимыми. Диссертация представляет собой законченную работу, автореферат диссертационной работы и опубликованные автором научные труды в достаточной мере отражают содержание диссертации.

### **Содержание диссертации**

Во введении автор отмечает актуальность темы исследования и степень ее разработанности, формулирует цель, задачи, характеризует научную новизну, теоретическое и практическое значение, и приводит список положений, выносимых на защиту. Приводятся сведения об апробации работы на научных конференциях и о печатных работах, опубликованных по теме диссертации.

Глава «Обзор литературы» начинается с общего описания белков, узнающих посттрансляционные модификации, а также описания роли структурно-разупорядоченных участков в белок-белковых взаимодействиях. Затем автор описывает историю исследования белков 14-3-3, их изоформы и филогению, распространение в тканях человека. Далее рассматривается пространственная структура белков 14-3-3, принципы их взаимодействия с фосфорилированными участками белков-партнеров, а также некоторые известные способы регуляции функционирования белков 14-3-3. В конце главы дается экскурс по особенностям интерактома белков 14-3-3, и более подробно описывается один из ключевых белков-партнеров 14-3-3, малый белок теплового шока HSPB6, участвующий в регуляции расслабления гладкой мускулатуры. Глава «Обзор литературы» содержит описание всех терминов и понятий, необходимых для понимания последующих глав диссертации, а также обосновывает цель и задачи работы, выявляя плохо исследованные области и подчеркивая наиболее значимые научные вопросы, исследованию которых посвящена диссертационная работа.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание многочисленных методов, использованных для решения поставленных в работе задач. Рекомбинантные аналоги белков человека, использованные в работе, были получены в клетках *E.coli* и очищены с помощью комбинации хроматографических методов. Анализ структуры, физико-химических свойств

белков и их взаимодействия выполнен с привлечением широкого набора современных методов молекулярной биологии, биохимии, биофизики и структурной биологии. Приведенные модификации методов сопровождаются указанием оригинальных источников и изложены достаточно подробно для воспроизведения поставленных экспериментов и подтверждения полученных в работе результатов.

Глава «Результаты и обсуждение» посвящена собственным результатам, полученным Случанко Н.Н., и разделена на 3 части, соответствующие основным направлениям исследований. Первая часть содержит описание результатов, полученных при исследовании олигомерного состояния белков 14-3-3 и HSPB6 человека, механизма их взаимодействия, и определении пространственной структуры комплексов 14-3-3 с фрагментами и полноразмерным белком HSPB6. Приведены результаты исследования ингибирующего эффекта анионов на взаимодействие белков 14-3-3 и фосфорилированного белка HSPB6. Описана пространственная структура комплекса 14-3-3/pHSPB6, полученная методом рентгеновской кристаллографии, а также структура комплекса в растворе, охарактеризованная по данным ограниченного протеолиза, дисульфидных кросс-сшивок и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. Первая часть заканчивается описанием возможного молекулярного механизма сборки комплекса 14-3-3/pHSPB6, а также анализом применимости полученной структурной информации для разработки лекарств.

Вторая часть главы «Результаты и обсуждение» посвящена разработке оригинальных методов, облегчающих получение фосфорилированных белков-партнеров и структурные исследования их комплексов с белками 14-3-3. В начале этой части приведены данные о создании и оптимизации системы ко-экспрессии фосфорилируемого белка с каталитически активной субъединицей протеинкиназы А, что позволило автору успешно получить несколько фосфобелков и охарактеризовать ключевые участки молекул доступные для фосфорилирования. Далее, на основе системы ко-экспрессии, автор описывает новый подход, основанный на рекомбинантной продукции и последующих структурных исследованиях химерных конструкций, содержащих белок 14-3-3 и фосфорилируемый фрагмент белка-партнера, соединенные коротким гибким линкером. С использованием этого оригинального подхода, в работе получены кристаллические структуры нескольких изоформ белка 14-3-3 человека с фосфорилированными участками физиологически значимых белков-партнеров. В конце второй части описана попытка создания химеры белка 14-3-3 с полноразмерным белком-партнером pHSPB6, а также приведены результаты анализа структуры слитной конструкции в растворе методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

Третья часть главы «Результаты и обсуждение» посвящена получению и исследованию мономерной формы белка 14-3-3. Показано, что полностью мономерная форма белка 14-3-3,



может быть получена путем введения нескольких мутаций в область интерфейса димеризации. В результате исследования модельных мономерных форм белка в диссертационной работе показано, что мономер 14-3-3 имеет сниженную термостабильность и в то же время обладает некоторыми особенностями белков-шаперонов, а именно, имеет повышенную гидрофобность поверхности и склонность к структурной разупорядоченности участков, находящихся на интерфейсе димеризации. На основании полученных данных, автором выдвинута гипотеза о роли этого интерфейса в проявлении шаперон-подобной активности мономерных и димерных форм белков семейства 14-3-3. Эта гипотеза подтверждена в ходе исследования способности мономеров и димеров этих белков предотвращать агрегацию нескольких модельных белков-субстратов с разным механизмом агрегации.

В конце описания результатов сделано обобщающее заключение, а также сформулированы выводы. Все экспериментальные данные диссертационной работы получены с применением доступных, надежных и эффективных методов. Выводы, сформулированные в диссертации, логично вытекают из результатов проведенных исследований и являются в полной мере обоснованными. Результаты диссертационного исследования опубликованы в престижных рецензируемых международных журналах.

#### **Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов**

Проведено комплексное структурно-функциональное исследование, в результате которого установлен молекулярный механизм взаимодействия белков 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 некоторыми его фрагментами. Разработан и валидирован оригинальный подход, основанный на химерах белков 14-3-3 с фосфопептидами белков-партнеров, позволяющий определять пространственные структуры физиологически значимых комплексов, перспективных с точки зрения разработки лекарств. Получены первые трехмерные структуры комплексов 14-3-3 с фосфорилированными фрагментами стероидогенного регуляторного белка STARD1 и онкобелка E6 из двух распространенных подтипов вируса папилломы человека (HPV16 и HPV18). В случае белка E6 были установлены не только одна из первых структур 14-3-3 с фосфорилированным С-концевым мотивом вида pS/pTXX-COOH (фосфопептид III типа), но и впервые определена структура тройного комплекса 14-3-3/фосфопептид III/молекула модулятор (фузикоцин).

### **Практическая значимость работы**

Анализ полученной структуры комплекса 14-3-3/pHSPB6 позволил выявить три молекулярных интерфейса, которые могут быть использованы для подбора низкомолекулярных модуляторов этого взаимодействия. Такие модуляторы могут иметь фармакологический потенциал и служить прототипами новых лекарственных препаратов. В диссертационной работе разработано несколько новых подходов позволяющих получать рекомбинантные фосфорилированные белки, их фрагменты и их комплексы с белками 14-3-3. Эти методы могут применяться для широкого круга работ, начиная от фундаментальных структурных исследований комплексов 14-3-3, исследований комплексов 14-3-3 с низкомолекулярными соединениями в фармакологии, а также для протеомных высокопоточных исследований интерактома белков 14-3-3. Полученные структурные данные о комплексе белков 14-3-3 с пептидом онкобелка E6 вируса папилломы человека могут помочь в развитии подходов к лечению папилломавирусных инфекций в будущем.

### **Апробация диссертации и личный вклад соискателя**

Основные результаты диссертации Случанко Н.Н. прошли успешную апробацию на Российских и международных конференциях, на которых они представлялись в том числе и в виде устных докладов. Результаты работы опубликованы в виде 20 статей в международных рецензируемых журналах входящих в перечень ВАК и одной главе в книге. В ходе работы определено 14 новых пространственных структур, координаты атомов и структурные факторы депонированы в Protein Data Bank (коды 5LTW, 5LU1, 5LU2, 5OKF, 5LUM, 5OK9, 5OM0, 5OMA, 6T5F, 6T5H, 6T80, 6TWZ, 6ZFD, 6ZFG).

Большинство исследований, вошедших в диссертацию, выполнено непосредственно самим соискателем, либо под его руководством. Некоторые этапы работы выполнены в сотрудничестве с другими исследователями, однако во всех случаях постановку задач осуществлял соискатель.

### **Замечания по работе**

Диссертация написана очень хорошим литературным языком и практически не содержит опечаток. К ней могут быть предъявлены следующие замечания:

1. Во вводной части и выводах из диссертационной работы (и автореферата) ни при описании актуальности работы, ни при постановке целей и описании объектов исследования не упоминается источник (организм) изучаемых белков семейства 14-3-3. Единственное



упоминание организма в водной части работы относится к белку теплового шока «HSPB6 человека». Впервые о том, что в работе изучались 14-3-3 белки человека мы узнаем только во второй главе диссертации (таблица 9, стр. 60, стр. 16 автореферат).

2. Аналогичное замечание о существовании различных изоформ белка 14-3-3 человека и нескольких (трех) типов фосфопептидов, которые с ними взаимодействуют, относится только к автореферату работы. О том, что существует семь изоформ 14-3-3 впервые упоминается на стр. 16 автореферата, хотя в предыдущих частях работы уже есть указания на изучение конкретных форм ( $\gamma$ ,  $\zeta$ ,  $\sigma$ ) этого белка. Различные типы фосфопептидов впервые упоминаются на стр. 33 автореферата. При этом, речь сразу идет о пептиде III-го типа. Отсутствие вводной характеристики различных изоформ и типов делает трудным понимание некоторых особенностей работы при ознакомлении с авторефератом.
3. В автореферате работы токсин фузикокин описан как стабилизатор взаимодействий с участием белков 14-3-3, и в то же время описывается его ингибирующее действие на формирование комплекса 14-3-3/Е6. Это противоречие не объяснено. В самом тексте диссертации (стр. 199-202) присутствует полное описание, позволяющее сравнить имеющиеся литературные данные и результаты, полученные автором. Однако отсутствие краткого упоминания исходных литературных данных в автореферате ставит читателя в тупик.
4. Результаты работы (стр 175, стр. 30 автореферат) не дают точного ответа на вопрос может ли остаток pS195 белка STARD1 связываться с белком 14-3-3 *in vivo*. Высказанная гипотеза о том, что разворачивание пространственной структуры белка STARD1, необходимое для этого взаимодействия, происходит при транспорте белка в митохондрии – чрезвычайно интересна. Однако это предположение требует экспериментальной проверки. Схожее замечание касается предположения о возможном взаимодействии Bcl-2-подобного белка 11 и белка 1, взаимодействующего с семейством RAB11, с белками семейства 14-3-3. В работе не рассмотрено, упорядочены ли соответствующие участки белков, и могут ли эти взаимодействия потенциально реализовываться в клетке.
5. В подвижных участках димера белка HSPB6 есть два свободных остатка Cys, которые, как показано в работе, при образовании комплекса с белком 14-3-3 могут сближаться на расстояние, достаточное для формирования дисульфидной связи. В связи с этим, интересно было бы рассмотреть вопрос о возможной роли комплексов 14-3-3/pHSPB6 в качестве сенсора внутриклеточного редокс-потенциала.
6. При исследовании формирования комплекса между изолированным АКД В6 и белком 14-3-3 $\sigma$  методом гель-фильтрации (рис. 47, автореферат рис. 7), даже при отсутствии наблюдаемого эффекта, необходимо провести хотя бы грубую оценку константы

диссоциации комплекса снизу, например  $K_d \gg 50$  мкМ. В случае многоточечного связывания многочисленные низкоаффинные взаимодействия могут приводить к эффективному комплексообразованию.

7. На стр. 179 (стр. 30 автореферат) указано, что «вариации кристаллических форм химер белка 14-3-3 с фосфопептидами увеличивают шансы на получение структурной информации». Это предположение верно лишь отчасти. Возможны ситуации, когда при наличии нескольких типов кристаллов белка все они имеют низкое качество и не позволяют разрешить структуру с необходимой точностью.
8. В диссертации используется довольно большое число сокращений, что неудивительно, учитывая большой объем проведенных исследований, а также большое количество белков – объектов исследования, и использованных методов. В некоторых случаях, при использовании последовательных сокращений, нарушается порядок слов, свойственный русскому языку, или опускаются отдельные слова. Кроме того, встречаются стилистические ошибки и жаргонизмы. Например:
  - (стр. 12) «с помощью инженерии димерного интерфейса», должно быть «с помощью замен (мутаций) в интерфейсе димеризации»
  - (стр. 12) «для ... получения фосфорилированных белков и их комплексов 14-3-3», должно быть «комплексов с белками 14-3-3»
  - (стр. 27, 34, 41) «С-концевые хвосты»
  - (стр. 48, 57 и стр. 14, 17 автореферат) «изолированный В6 АКД», должно быть «изолированный АКД В6». По-русски «изолированный  $\alpha$ -кристаллиновый домен белка HSPB6».
  - (стр. 56, 57 и стр. 25 автореферат) «фьюжн-конструкции с МВР», должно быть «слитные конструкции с МВР»

Высказанные замечания не снижают общей положительной оценки работы. Сделанные замечания не касаются основного содержания рассматриваемой диссертации и не влияют на общую высокую оценку научного уровня и выполненной работы.

### **Заключение**

Таким образом, диссертация Случанко Николая Николаевича «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия, является завершенной научно-квалификационной работой, полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о



порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством РФ (Постановление № 842 от 24.09.2013 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, и заслуживает высокой оценки, а автор диссертации, Случанко Николай Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Отзыв на диссертацию Случанко Н.Н. обсужден и одобрен на открытом семинаре Отдела структурной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук 10 декабря 2020 года (протокол заседания № 2020-5).

Отзыв составил:

Шенкарёв З.О., д.ф.-м.н. профессор РАН

главный научный сотрудник,

Руководитель лаборатории структурной биологии ионных каналов

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10

Эл. почта [zakhar-shenkarev@nmr.ru](mailto:zakhar-shenkarev@nmr.ru),

Тел. +7(903)7176278



Шенкарев З.О.

Подпись г.н.с. Шенкарёва З.О. заверяю

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

РАН.

  
д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

