

## ОТЗЫВ НАУЧНОГО КОНСУЛЬТАНТА

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

Николай Николаевич Случанко с отличием окончил кафедру биохимии биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова в 2008 году. С 2008 по 2011 год Н.Н. Случанко был аспирантом кафедры биохимии биологического факультета МГУ и в 2011 году он защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Влияние мутаций, имитирующих фосфорилирование белка 14-3-3 $\zeta$ , на его структуру и некоторые свойства» по специальности 03.01.04 Биохимия. В 2011 году перешел в Институт биохимии РАН, создал свою научную группу и продолжил углубленные исследования структуры и молекулярных механизмов функционирования универсальных регуляторных белков семейства 14-3-3.

Н.Н. Случанко является самостоятельным ученым, активно участвующим в различных научных мероприятиях, конференциях и школах, и развивает сотрудничество с несколькими российскими и международными лабораториями. Диссертант руководит дипломными и диссертационными работами выпускников кафедры биохимии биологического факультета МГУ, а также участвует в чтении спецкурса по физико-химическим методам исследования белков и в проведении ежегодной конференции молодых ученых «Ломоносов».

В начале своего диссертационного исследования Н.Н. Случанко провел подробное исследование четвертичной структуры 14-3-3 и некоторых малых белков теплового шока в растворе. Используя методы малоуглового рентгеновского рассеяния, седиментации и гель-фильтрации диссертант показал, что 14-3-3 представлен в виде стабильных димеров с плотным центральным ядром и подвижным С-концевым доменом. При изучении свойств одного из потенциальных белков-партнеров 14-3-3, малого белка теплового шока HSPB6, Н.Н. Случанко было обнаружено, что в условиях краудинга этот белок склонен к самоассоциации, а фосфорилирование Ser16 в структуре этого белка препятствует такой самоассоциации и способствует сохранению димерной структуры, наиболее подходящей для взаимодействия с 14-3-3. Эти предварительные исследования были необходимыми для дальнейшего подробного анализа 14-3-3 с разными белками-мишенями.

Продолжая исследование взаимодействия HSPB6 с 14-3-3, Н.Н. Случанко предположил, что основной движущей силой такого взаимодействия является взаимодействие фосфорилированного N-концевого домена HSPB6 с амфифильной канавкой в структуре 14-3-3. Если это предположение было бы справедливым, то можно было ожидать, что неорганический фосфат и низкомолекулярные эфиры фосфорной кислоты (такие как глицерофосфаты или фосфосахара) смогут конкурировать с HSPB6 за связывание с 14-3-3. Это предположение было проверено в серии экспериментов, и было убедительно показано, что неорганический фосфат, а также глицерофосфаты эффективно конкурируют с фосфорилированным HSPB6 за связывание с 14-3-3. Более того, были получены

кристаллографические данные, свидетельствующие о том, что неорганический фосфат, действительно, связывается в амфипатической канавке 14-3-3. Эти данные представляют несомненный интерес, потому что неорганический фосфат (и фосфорсодержащие низкомолекулярные соединения) могут выступать в качестве эффективного селектора, регулирующего взаимодействие 14-3-3 с различными белками мишенями и предотвращающими связывание мишеней, обладающих сравнительно низким сродством к 14-3-3. Логичным продолжением этих исследований стали эксперименты, направленные на изучение взаимодействия фосфопептида HSPB6 с 14-3-3. В ходе этих экспериментов были получены кристаллы 14-3-3, несущие в амфипатической канавке фосфорилированный пептид HSPB6, были подробно картированы участки взаимодействия и определена константа связывания фосфорилированного пептида с 14-3-3.

Проведенные исследования сделали возможным приступить к изучению взаимодействия интактного полноразмерного фосфорилированного HSPB6 с различными изоформами 14-3-3. Н.Н. Случанко проанализировал взаимодействие HSPB6 с семью различными изоформами 14-3-3 и показал, что комплекс, образованный  $\sigma$ -изоформой 14-3-3 и фосфорилированным HSPB6 может быть успешно закристаллизован. Эта часть работы была крайне трудоемкой и потребовала больших усилий как по подбору условий кристаллизации, так и по оптимизации структуры 14-3-3 с заменой некоторых высоко подвижных аминокислотных остатков, что было необходимым для получения кристаллов комплекса двух белков. В ходе этих исследований удалось получить кристаллы, в которых димер 14-3-3 был связан с димером фосфорилированного HSPB6. Эти результаты заслуживают особого внимания и самой высокой оценки. Во-первых, была установлена полная структура комплекса 14-3-3 с белком-мишенью. Это является несомненным достижением, потому что до выполнения этих исследований в литературе была описана структура только одного комплекса 14-3-3 (с ферментом AANAT). Публикация данных по структуре комплекса 14-3-3 с фосфорилированным HSPB6 вызвала большой интерес, и вслед за этой работой в литературе появилось несколько кристаллических структур 14-3-3 с разными белками мишенями. Во-вторых, в работе Н.Н. Случанко впервые была получена структура полноразмерного малого белка теплового шока. Белки, относящиеся к этому семейству, склонны образовывать высокоподвижные олигомерные комплексы, кристаллизация которых крайне затруднительна. Поэтому в литературе отсутствовали данные о структуре каких-либо полноразмерных малых белков теплового шока, и поэтому результаты, полученные Н.Н. Случанко, представляют особый интерес. Н.Н. Случанко не остановился на достигнутом и дополнил свои исследования структуры комплекса фосфорилированный HSPB6–14-3-3 опытами, проведенными в растворе. Используя методы малоуглового рентгеновского рассеяния, флуоресцентной спектроскопии и ограниченного протеолиза, Н.Н. Случанко получил дополнительные подтверждения структуры комплекса, образованного двумя белками.

Проанализировав взаимодействие HSPB6 с 14-3-3, Н.Н. Случанко приступил к разработке экспериментальных подходов, позволяющих собирать комплексы 14-3-3 с

фосфорилированными белками без выделения изолированных белков прямо в бактериальных клетках. Для этих целей диссертант подобрал условия одновременной экспрессии в клетках *E.coli* cAMP-зависимой протеинкиназы, белка-мишени и различных изоформ белка 14-3-3. Эта система удобна и позволяет изменять состав белков-партнеров по желанию экспериментатора. Такой подход позволил получить препараты тау белка, фосфорилированные по многочисленным участкам, узнаваемым 14-3-3, и даже выделить комплекс 14-3-3 с фосфорилированным тау белком.

Получение изолированных полностью фосфорилированных пептидов белков-мишеней является дорогой и достаточно сложной задачей. Н.Н. Случанко предложил новый оригинальный подход, позволяющий получить комплекс 14-3-3 с пептидами белков-мишеней. Им было предложено и сконструировано несколько белков-химер, где к подвижному С-концу 14-3-3 через линкер были прикреплены различные пептиды нескольких потенциальных белков мишеней 14-3-3. Среди этих пептидов был пептид, принадлежащий HSPB6, а также пептиды, принадлежащие разнообразным белкам (Gli, STARD1, AANAT, BAD и E6). Полученные химерные конструкции ко-экспрессировались вместе с cAMP-зависимой протеинкиназой в *E.coli*, очищались и подвергались кристаллизации. Подробное исследование методом рентгеноструктурного анализа позволило получить богатую и оригинальную информацию о механизме взаимодействия различных белков-мишеней с 14-3-3. Все полученные данные интересны и оригинальны, но мне кажется, что особого внимания заслуживают данные, полученные при анализе связывания пептида, принадлежащего онкобелку белку E6 вируса папилломы человека (HPV). Участок связывания 14-3-3 располагается на С-конце исследуемого белка E6, т.е. принадлежит наименее изученному, так называемому третьему типу участков связывания 14-3-3. Именно поэтому кристаллографические данные, полученные с использованием этого химерного белка, представляют особый интерес. В этой же части работы было исследовано влияние фузикокина, известного модулятора взаимодействий 14-3-3 с белками-мишенями, и было показано, что в отличие от многих ранее описанных экспериментов, в случае белка E6 и 14-3-3, фузикокин не усиливает, а, наоборот, ослабляет взаимодействие анализируемого фосфопептида с 14-3-3.

В последнее время в литературе появились данные о том, что в дополнение к ранее описанным свойствам, 14-3-3 в определенных условиях способен проявлять так называемую шапероноподобную активность, т.е. способен предотвращать агрегации частично денатурированных белков. Оставалось непонятным, какие участки 14-3-3 могут участвовать в такой шапероноподобной активности. Подробный анализ литературы и собственные экспериментальные данные позволили Н.Н. Случанко высказать предположение, что взаимодействие двух мономеров 14-3-3 может осуществляться за счет многочисленных гидрофобных контактов, образуемых подвижными спиральями, расположенными в N-концевой части молекулы 14-3-3. Для проверки этого предположения Н.Н. Случанко провел направленный мутагенез в N-концевых спиральных участках 14-3-3 и получил несколько мутантных форм этого белка. Оказалось, что в полном согласии с ранее высказанным

предположением полученные мутантные формы не были способны димеризоваться и были представлены мономерами, для которых характерна пониженная термостабильность и повышенная чувствительность к протеолизу. Мне кажется, что исследование структуры и свойств мономерных форм 14-3-3 представляет интерес, потому что в определенных условиях становится возможным диссоциация димеров этого белка, кроме того сборка гетеродимеров 14-3-3 тоже возможна только через промежуточную стадию мономеризации.

Диссоциация димеров 14-3-3 сопровождается экспонированием ранее скрытых в области интерфейса гидрофобных участков. С одной стороны это приводит к дестабилизации образующихся мономеров, а с другой стороны делает мономерные формы способными взаимодействовать с частично денатурированными белками, которые несут на своей поверхности гидрофобные участки. Это приводит к тому, что помимо своих многочисленных свойств, подробно описанных в литературе, 14-3-3 может приобретать еще шапероноподобные свойства, т.е. оказывается способным предотвращать агрегацию частично денатурированных белков. В тщательно проведенных экспериментах Н.Н. Случанко убедительно показал, что 14-3-3 может обладать шапероноподобной активностью по отношению к нескольким белкам-субстратам, и при этом мономерные формы 14-3-3 обладают более выраженной шапероноподобной активностью, чем их димерные формы.

Завершая анализ диссертационной работы Н.Н. Случанко, можно заключить, что эта работа посвящена интересной и актуальной проблеме, выполнена на очень высоком уровне с использованием широкого арсенала самых современных экспериментальных методов и подходов и содержит новые, оригинальные экспериментальные данные. Свидетельством высокого качества работы являются многочисленные публикации в высокорейтинговых международных научных изданиях. У меня нет никаких сомнений в том, что работа Н.Н. Случанко соответствует самым высоким требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присвоения этой степени.

Отзыв дан для представления в Диссертационный Совет Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Заведующий кафедрой биохимии  
Биологического факультета МГУ,  
доктор биологических наук  
по специальности 03.01.04 Биохимия,  
член-корреспондент РАН

15 октября 2020 г.

Гусев Николай Борисович  
телефон 7-495-939-2747  
эл.почта: [NBGusev@mail.ru](mailto:NBGusev@mail.ru)



*гусев* *ЕВ Петров*