

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Н. Н. Случанко «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности
03.01.04 – Биохимия

Современные методы позволяют получить и исследовать рекомбинантные белки, низкое содержание которых в тканях затрудняет их выделение, и таким образом способствовать выявлению внутриклеточных биохимических процессов, ранее мало доступных для изучения. К таким белкам относятся, в частности, регуляторные белки семейства 14-3-3, которые обнаружены во всех эукариотических клетках. Белки 14-3-3 способны взаимодействовать с большим количеством разнообразных регуляторных и сигнальных белков, в том числе киназами, фосфатазами и трансмембранными рецепторами. При этом белки 14-3-3 не только взаимодействуют с фосфорилированными белками-партнерами, но и, напротив, взаимодействие с белками-мишенями может регулироваться путем фосфорилирования белков 14-3-3. Белки семейства 14-3-3 участвуют в регуляции множества клеточных процессов, таких как клеточный цикл, деление клеток, апоптоз, продукция гормонов, функционирование ионных каналов, организация цитоскелета и других. Кроме того, белки семейства 14-3-3 обладают также шапероно-подобной функцией, т.е. способностью предотвращать агрегацию других белков, что важно для поддержания клеточных функций и актуально в связи с существованием так называемых «конформационных» болезней, связанных с агрегацией белков, структура которых нарушена. Такое многообразие функций указывает на конформационную подвижность белков 14-3-3, изучение которой представляет большой интерес. Поэтому работа Н.Н. Случанко, направленная на изучение молекулярных механизмов взаимодействия белков семейства 14-3-3 с фосфорилированными белками-партнерами, изучение процессов димеризации 14-3-3 и их шапероно-подобной активности, актуальна и необходима для понимания регуляторных процессов и белок-белковых взаимодействий в клетке и развития научных исследований в этом направлении.

В ходе работы Н.Н. Случанко была разработана высокоэффективная система ко-экспрессии целевых белков и протеинкиназы А в бактериях *E.coli*, которая обеспечивает получение белков с высокой степенью фосфорилирования. На основе этой системы предложен оригинальный метод получения кристаллических структур комплексов 14-3-3 с фосфопептидами белков-партнеров. Использование этого метода позволило получить новые кристаллические структуры комплексов белка 14-3-3 с фрагментами физиологически значимых белков-партнеров 14-3-3. Это белок теплового шока HSPB6, транскрипционный фактор Gli, фермент регуляции циркадных ритмов AANAT, а также два фосфопептида белка STARD1 вокруг остатков Ser57 и Ser195, фосфорилируемых PKA.

В этой серии работ была впервые определена трехмерная структура белка 14-3-3 в комплексе с полноразмерным малым белком теплового шока HSPB6. В этой структуре локализованы участки, которые, по-видимому, можно использовать для создания фармакологических соединений, способных регулировать взаимодействие белков 14-3-3 и HSPB6 и сократительную активность гладких мышц. Кроме того, при исследовании взаимодействия белка 14-3-3 с фосфорилированным HSPB6 выявлены механизм образования, стабильность и стехиометрия комплекса и показана ключевая роль связывания фосфопептида RRApS16APLP белка HSPB6 в амфипатической бороздке 14-3-3. Показано также, что ионы фосфата ингибируют это взаимодействие за счет блокирования амфипатических бороздок 14-3-3.

Приоритетными являются также результаты, полученные при анализе N-концевой области белка 14-3-3, которая важна для образования димеров. Направленный мутагенез аминокислотных остатков в этой области позволил получить мономерные формы белка 14-3-3 и впервые установить, что они обладают пониженной стабильностью, повышенной гидрофобностью и анти-агрегационной активностью по отношению к некоторым белкам-субстратам. В частности, в отличие от малоэффективных димеров 14-3-3, мономеры 14-3-3 демонстрировали дозо-зависимый шапероно-подобный эффект, препятствуя агрегации и преципитации алкогольдегидрогеназы. Кроме того, более высокая антиагрегационная активность мономеров 14-3-3 была также показана для инсулина и киназы гликогенфосфорилазы. На основании этих экспериментов предложена оригинальная модель «шагающего» механизма, позволяющего димерам 14-3-3 осуществлять обмен субъединицами и проявлять антиагрегационную активность, раскрывая часть интерфейса, без полной мономеризации белка.

Для решения поставленных задач в работе Н.Н. Случанко было использовано впечатляющее количество молекулярно-биологических, биохимических и биофизических подходов. Это методы клонирования и сайт-направленного мутагенеза, энзиматическая модификация рекомбинантных белков и их ограниченный протеолиз, абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, поляризация флуоресценции, круговой дихроизм, динамическое светорассеяние, аналитическое ультрацентрифугирование, дифференциальная сканирующая калориметрия и изотермическая калориметрия титрования. Кроме того, в работе широко использованы такие методы структурной биологии как малоугловое рассеяние рентгеновских лучей и монокристаллическая рентгеновская кристаллография. Перечисление этих методов, использованных в одной работе, наряду с результатами работы, полученных с помощью этих методов, свидетельствует о том, что Н.Н. Случанко является высокопрофессиональным специалистом в области создания рекомбинантных белков и изучения структурных особенностей и физико-химических свойств белков и белковых комплексов.

Автореферат диссертации содержит достаточно полную информацию о результатах работы и перспективности их применения как в структурной биохимии, так и для разработки лекарств в ряде патологий, включая нарушения работы гладкой мускулатуры, муковисцидоз, нейродегенеративные и онкологические заболевания. Хочется также отметить прекрасные иллюстрации, которые активно способствуют восприятию результатов.

Таким образом, диссертационная работа Н. Н. Случанко «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3» является завершенным научно-квалификационным исследованием, научную новизну и значимость результатов которого можно охарактеризовать как крупное достижение в биохимии. Диссертация является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук (пп. № 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Автор диссертации Н.Н. Случанко заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии Российской академии наук,
Ведущий научный сотрудник,
доктор биологических наук



С.Ю. Хайтлина



Контактные данные организации: 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
Тел. 8-812-2972918, E.mail: cellbio@incras.ru; Sofia Khaitlina skhspb@gmail.com