



ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ  
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2  
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32  
www.fbras.ru, info@fbras.ru

На №

от

28.09.2020

№ 85-01-19/954



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального  
государственного учреждения  
«Федеральный  
исследовательский центр  
«Фундаментальные основы  
биотехнологии» РАН

Федоров Алексей Николаевич

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН на диссертационную работу Случанко Николая Николаевича «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия, выполненную в группе белок-белковых взаимодействий Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

В 2008 году Случанко Н.Н. окончил кафедру биохимии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова с присуждением квалификации дипломированного специалиста по специальности Биохимия. С 2008 по 2011 гг. обучался в очной аспирантуре на кафедре биохимии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. В 2011 году Случанко Н.Н. защитил кандидатскую диссертацию «Влияние мутаций, имитирующих фосфорилирование белка 14-3-3 $\zeta$ , на его структуру и некоторые свойства» по специальности 03.04.01 Биохимия (диплом ДКН № 154262) и перешел на работу в лабораторию молекулярной организации биологических структур под руководством проф. д.б.н. Левицкого Д.И. в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН. В 2017 году в том же институте была образована группа белок-белковых взаимодействий при дирекции, которую возглавил Случанко Н.Н. и где работает по настоящее время в должности ведущего научного сотрудника.

Научный консультант – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор Гусев Николай Борисович, заведующий кафедрой биохимии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

По результатам рассмотрения диссертации «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3» принято следующее заключение:

### Актуальность работы

Проблемы узнавания крайне важны в биологии. Актуальны они и для таких систем как белок-белковые взаимодействия (ББВ), которые лежат в основе подавляющего числа жизненно-важных процессов на молекулярном уровне. Нормальное функционирование живой клетки сложно себе представить без скоординированной и лабильной системы взаимодействий с участием белков. Определение прочности, селективности и механизма

конкретных ББВ составляет одну из ключевых задач современной биохимии и молекулярной биологии. Решение этой важной фундаментальной задачи также позволяет получать знания, необходимые для разработки лекарственных препаратов для людей с различными патологиями, а потому имеет чрезвычайную актуальность.

Крайне важным свойством многих ББВ является их *регулируемость*, за счет чего белковые комплексы возникают только в ответ на определенный сигнал и контролируемо диссоциируют, будучи неволевыми. Одним из эффективных механизмов регуляции ББВ является *фосфорилирование* – катализируемый ферментами-протеинкиназами перенос фосфатной группы с молекулы АТФ на определенные остатки в составе белка-мишени, в результате чего меняются его свойства и узнаваемость другими белками. Активность фосфатаз за счет *дефосфорилирования* обеспечивает обратимость регуляции.

Белки семейства 14-3-3 широко распространены у эукариот и являются универсальными белками-регуляторами, которые селективно узнают белки-партнеры, фосфорилированные по остаткам серина или треонина в определенных последовательностях. Фосфопептид-связывающая функция 14-3-3 основана на их димерной структуре, однако фосфорилирование самих 14-3-3 также 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, 14-3-3 участвуют в регуляции апоптоза, клеточного деления, функционирования транскрипционных факторов, продукции гормонов и т.д. [1]. Недавно была описана *шапероно-подобная* функция 14-3-3, которая заключается в предотвращении агрегации других белков, что актуально при развитии так называемых «конформационных» болезней, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [2]. В связи с полифункциональностью, 14-3-3 и их комплексы являются потенциальной мишенью для разработки лекарств при ряде серьезных патологий, включая нарушения работы гладкой мускулатуры, муковисцидоз, а также нейродегенеративные и онкологические заболевания [3].

Ключом к коррекции этих патологий может стать определение молекулярных механизмов образования и пространственных структур комплексов с участием 14-3-3. Однако среди сотен экспериментально подтвержденных, физиологически значимых взаимодействий с участием 14-3-3 комплексы с установленной структурой исчисляются единицами. Структурные исследования серьезно осложняются необходимостью получения стехиометрически фосфорилированных белков-партнеров 14-3-3 и 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.

1. Obsil, T. and V. Obsilova, *Structural basis of 14-3-3 protein functions*. Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(7): p. 663-72.
2. Yano, M., et al., *A novel function of 14-3-3 protein: 14-3-3zeta is a heat-shock-related molecular chaperone that dissolves thermal-aggregated proteins*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(11): p. 4769-79.
3. Stevers, L.M., et al., *Modulators of 14-3-3 Protein-Protein Interactions*. J Med Chem, 2018. **61**(9): p. 3755-3778.

**Целью** работы стало исследование молекулярных механизмов взаимодействия белков 14-3-3 с фосфорилированными белками-партнерами, а также изучение процессов димеризации 14-3-3 и их шапероно-подобной активности.

**Новизна и ценность результатов, полученных лично автором в ходе научного исследования**

-Проведено комплексное структурно-функциональное исследование, в результате

которого установлен молекулярный механизм взаимодействия 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 его фрагментами.

-Продемонстрирована применимость разработанного подхода, основанного на химерах 14-3-3 с фосфопептидами, для решения структур физиологически значимых комплексов, перспективных с точки зрения разработки лекарств, в том числе получены первые структуры комплексов 14-3-3 с фосфорилированными фрагментами стероидогенного регуляторного белка STARD1 и онкобелка E6 вируса папилломы человека.

-В случае E6 была установлена не только одна из первых структур 14-3-3 с фосфорилированным С-концевым мотивом вида pS/pTXX-COOH, но и показана селективность действия фузикокина – широко известного стабилизатора взаимодействий с участием 14-3-3, который в случае 14-3-3/E6 оказывал умеренное ингибирующее действие.

### **Научно-практическое значение**

-Полученные структурные данные о связывании 14-3-3 с HSPB6 позволили выявить ключевые молекулярные интерфейсы, которые привлекательны с точки зрения подбора низкомолекулярных модуляторов, обладающих терапевтическим потенциалом.

-Разработаны подходы для более быстрого и удобного получения фосфорилированных белков и их комплексов 14-3-3 для структурных исследований, в том числе в высокопоточном формате, который востребован с учетом крайне обширного интерактома белков 14-3-3.

-С учетом высокого разрешения, структурные данные о комплексе 14-3-3 с пептидом от онкобелка E6 вируса папилломы человека могут помочь в развитии подходов к лечению папилломавирусных инфекций в будущем.

### **Конкретное личное участие автора в получении результатов**

Большинство исследований, вошедших в диссертацию, выполнено непосредственно самим соискателем, либо под его руководством. Научная работа соискателя была отмечена Медалью Президиума РАН (2012 г.), Стипендией Президента РФ (2016/2017), Премией правительства Москвы для молодых ученых (2019). Некоторые этапы работы выполнены в сотрудничестве с другими исследователями, однако во всех случаях постановку задач осуществлял соискатель.

### **Степень достоверности**

Представленные в диссертационной работе данные являются достоверными и надежными, а выводы и положения обоснованными. Работа выполнена с использованием широкого спектра классических и современных методов исследования в области биохимии, биофизики, молекулярной и структурной биологии.

### **Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите**

Представленная Случанко Николаем Николаевичем диссертационная работа посвящена исследованию молекулярных механизмов взаимодействия белков 14-3-3 с фосфорилированными белками-партнерами, а также изучению процессов димеризации 14-3-3 и их шапероно-подобной активности. Работа соответствует специальности 03.01.04

Биохимия, по которой она рекомендуется к защите.

### **Апробация работы**

Результаты исследования были представлены в виде стендовых и устных докладов на 9 международных конгрессах, конференциях и школах, а также на 5 российских мероприятиях, на ежегодной конференции ФИЦ Биотехнологии РАН и лектории кафедры биохимии МГУ им. Ломоносова «Ученые о своей работе».

### **Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени**

По теме диссертации опубликовано 21 печатная работа, в том числе в виде 20 статей в международных рецензируемых журналах и одной главе в книге, входящих в перечень ВАК. В ходе работы определены 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).

### **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ**

#### Статьи в международных рецензируемых журналах

1. **Sluchanko N. N.**, Sudnitsyna M. V., Seit-Nebi A. S., Antson A. A., Gusev N. B. Properties of the monomeric form of human 14-3-3zeta protein and its interaction with tau and HspB6 // *Biochemistry*. – 2011. – Т. 50, № 45. – С. 9797-808.
2. **Sluchanko N. N.**, Artemova N. V., Sudnitsyna M. V., Safenkova I. V., Antson A. A., Levitsky D. I., Gusev N. B. Monomeric 14-3-3zeta has a chaperone-like activity and is stabilized by phosphorylated HspB6 // *Biochemistry*. – 2012. – Т. 51, № 31. – С. 6127-38.
3. **Sluchanko N. N.**, Gusev N. B. Oligomeric structure of 14-3-3 protein: what do we know about monomers? // *FEBS Lett*. – 2012. – Т. 586, № 24. – С. 4249-56.
4. **Sluchanko N. N.**, Chebotareva N. A., Gusev N. B. Modulation of 14-3-3/phosphotarget interaction by physiological concentrations of phosphate and glycerophosphates // *PLoS One*. – 2013. – Т. 8, № 8. – С. e72597.
5. **Sluchanko N. N.**, Roman S. G., Chebotareva N. A., Gusev N. B. Chaperone-like activity of monomeric human 14-3-3zeta on different protein substrates // *Arch Biochem Biophys*. – 2014. – Т. 549. – С. 32-9.
6. **Sluchanko N. N.**, Chebotareva N. A., Gusev N. B. Quaternary structure of human small heat shock protein HSPB6 (Hsp20) in crowded media modeled by trimethylamine N-oxide (TMAO): Effect of protein phosphorylation // *Biochimie*. – 2015. – Т. 108. – С. 68-75.
7. **Sluchanko N. N.**, Uversky V. N. Hidden disorder propensity of the N-terminal segment of universal adapter protein 14-3-3 is manifested in its monomeric form: Novel insights into protein dimerization and multifunctionality // *Biochim Biophys Acta*. – 2015. – Т. 1854, № 5. – С. 492-504.
8. **Sluchanko N. N.**, Tugaeva K. V., Faletrov Y. V., Levitsky D. I. High-yield soluble expression, purification and characterization of human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) fused to a cleavable Maltose-Binding Protein (MBP) // *Protein Expr Purif*. – 2016. – Т. 119. – С. 27-35.
9. **Sluchanko N. N.**, Beelen S., Kulikova A. A., Weeks S. D., Antson A. A., Gusev N. B., Strelkov S. V. Structural Basis for the Interaction of a Human Small Heat Shock Protein with the 14-3-3 Universal Signaling Regulator // *Structure*. – 2017. – Т. 25, № 2. – С. 305-316.

10. **Sluchanko N. N.**, Gusev N. B. Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins // FEBS J. – 2017. – Т. 284, № 9. – С. 1279-1295.
11. **Sluchanko N. N.**, Tugaeva K. V., Greive S. J., Antson A. A. Chimeric 14-3-3 proteins for unraveling interactions with intrinsically disordered partners // Sci Rep. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 12014.
12. Tugaeva K. V., Tsvetkov P. O., **Sluchanko N. N.** Bacterial co-expression of human Tau protein with protein kinase A and 14-3-3 for studies of 14-3-3/phospho-Tau interaction // PLoS One. – 2017. – Т. 12, № 6. – С. e0178933.
13. **Sluchanko N. N.** Association of Multiple Phosphorylated Proteins with the 14-3-3 Regulatory Hubs: Problems and Perspectives // J Mol Biol. – 2018. – Т. 430, № 1. – С. 20-26.
14. Chebotareva N. A., Eronina T. B., Roman S. G., Mikhaylova V. V., **Sluchanko N. N.**, Gusev N. B., Kurganov B. I. Oligomeric state of alphaB-crystallin under crowded conditions // Biochem Biophys Res Commun. – 2019. – Т. 508, № 4. – С. 1101-1105.
15. **Sluchanko N. N.**, Bustos D. M. Intrinsic disorder associated with 14-3-3 proteins and their partners // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2019. – Т. 166. – С. 19-61.
16. Tugaeva K. V., Kalacheva D. I., Cooley R. B., Strelkov S. V., **Sluchanko N. N.** Concatenation of 14-3-3 with partner phosphoproteins as a tool to study their interaction // Sci Rep. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 15007.
17. Gogl G., Jane P., Caillet-Saguy C., Kostmann C., Bich G., Cousido-Siah A., Nyitray L., Vincentelli R., Wolff N., Nomine Y., **Sluchanko N. N.**, Trave G. Dual Specificity PDZ- and 14-3-3-Binding Motifs: A Structural and Interactomics Study // Structure. – 2020. – Т. 28, № 7. – С. 747-759.
18. **Sluchanko N. N.** Reading the phosphorylation code: binding of the 14-3-3 protein to multivalent client phosphoproteins // Biochem J. – 2020. – Т. 477, № 7. – С. 1219-1225.
19. Tugaeva K. V., Titterington J., Sotnikov D. V., Maksimov E. G., Antson A. A., **Sluchanko N. N.** Molecular basis for the recognition of steroidogenic acute regulatory protein by the 14-3-3 protein family // FEBS J. – 2020. – Т. 287, № 18. – С. 3944-3966.
20. Tugaeva K.V., Remeeva A., Gushchin I., Cooley R.B., **Sluchanko N.N.** Design, expression, purification and crystallization of human 14-3-3 $\zeta$  protein chimera with phosphopeptide from proapoptotic protein BAD // Protein Expr Purif. – 2020. – Т. 175C, 105707.

#### Глава в книге

21. HspB6 (Hsp20) as a versatile molecular regulator. The big book on small heat shock proteins. / Sudnitsyna M. V., **Sluchanko N. N.**, Gusev N. B. – Switzerland: Springer, 2015. The big book on small heat shock proteins. - 603с.

#### Избранные тезисы докладов

1. **Н.Н. Случанко.** Регуляторные белок-белковые взаимодействия на примере белков семейства 14-3-3. VI молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии. Санкт-Петербург. 2018. *Пленарная лекция.*
2. **Н.Н. Случанко**, С. Белен, И.С. Черник, Н.А. Чеботарева, А.А. Куликова, С.Д. Уикс, М.В. Судницына, А.С. Сеит-Неби, А.А. Антсон, Н.Б. Гусев, С.В. Стрелков. VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Механизм взаимодействия малого белка теплового шока HSPB6 с белками семейства 14-3-3. Москва. 2017. *Приглашенный доклад.*
3. **Н.Н. Случанко.** Проблема олигомерного состояния универсальных адаптерных белков семейства 14-3-3. V Съезд биохимиков России. 2016. *Приглашенный доклад.*

4. K. Tugaeva, D. Kalacheva, **N. Sluchanko**. 1433 protein chimera with its fulllength phosphorylated partner protein HSPB6: design, solution structure and dynamic. FEBS Congress. Krakow, Poland. FEBS Open Bio 9 (Suppl.1) (2019) 65–431, p. 260.
5. K. Tugaeva, J. Titterington, A. Antson, **N. Sluchanko**. Structural basis for the interaction of 14-3-3 proteins with phosphopeptides of STARD1 revealed by the chimeric approach. FEBS Congress. Krakow, Poland. FEBS Open Bio 9 (Suppl.1) (2019) 65–431, p. 257.
6. **Н.Н. Случанко**, В.Н. Уверский. Скрытая склонность к разупорядоченности N-концевого сегмента универсального адаптерного белка 14-3-3 проявляется в его мономерной форме. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Новосибирск. 2015.
7. **N. Sluchanko**, S. Roman, N. Chebotareva, N. Gusev. Chaperone-like activity of monomeric human 14-3-3 $\zeta$  on different protein substrates. FEBS/EMBO Congress. Paris, France. FEBS Journal 281 (Suppl. 1) (2014) 65–784. p. 242
8. **N.N. Sluchanko**, N.B. Gusev. Chaperone-like activity of the monomeric form of human 14-3-3Zeta protein. EMBO Conference. Sardinia, Italy. 2013. p. 99.
9. **Н.Н. Случанко**, М.В. Судницына, Н.Б. Гусев. Свойства мономерной формы универсального адаптерного белка 14-3-3. IV Съезд биофизиков России. Нижний Новгород. 2012. Симпозиум V, с. 31.
10. **N.N. Sluchanko**. Mutational approach for acquiring a model of the monomeric state of universal adaptor protein 14-3-3. Advanced FEBS Course “Sofia School of Protein Science: Structure and dynamics of biological macromolecules”. Sofia, Bulgaria. 2012, p. 31.

#### **Рекомендуемые оппоненты:**

**Кочетков Сергей Николаевич**, 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.

**Ширинский Владимир Павлович**, доктор биологических наук, профессор, Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ, заведующий лабораторией клеточной подвижности.

**Гривенников Игорь Анатольевич**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», заведующий лабораторией молекулярной генетики соматических клеток.

**Рекомендуемая ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН».

Диссертация «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3» Случанко Николая Николаевича на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий структурной биохимии белка, инженерной энзимологии, иммунобиохимии, молекулярной биотехнологии, молекулярной генетики и групп геномной инженерии низших эукариот и белок-белковых взаимодействий Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального

государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» путем открытого голосования. Присутствовало на семинаре – 29 человек. Результаты голосования: «за» – 29 человек, «против» – нет, «воздержались» – нет. Протокол № 3 от 18 сентября 2020 года.

*Председатель совместного семинара лабораторий*  
Заведующий лабораторией структурной биохимии белка,  
Доктор биологических наук, профессор

Д.И. Левицкий

*Секретарь*  
Младший научный сотрудник  
группы белок-белковых взаимодействий

К.В. Тугаева

