

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 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» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 18 февраля 2021 г. № 2
о присуждении Случанко Николаю Николаевичу, гражданство Российская Федерация,
ученой степени доктора биологических наук

Диссертация «Молекулярные основы функционирования белков семейства 14-3-3» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 5 ноября 2020 г. (протокол № 7) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Рособранзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. № 74/нк и от 10.02.2014 г. №55/нк и с учетом переименования Совета от 30.09.2015 г. № 1166/нк и от 13.03.2019 №222/нк и проведения заседания совета в удаленном интерактивном режиме согласно приказа Минобрнауки РФ №734 от 22.06.2020 и приказа №29-Д от 10.02.2021 Директора ФИЦ Биотехнологии РАН, доктора биологических наук А.Н. Федорова.

Соискатель

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 14-3-3ζ, 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 Институте биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН 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:

Гусев Николай Борисович, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

Официальные 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.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор химических наук, профессор, академик РАН Кочетков Сергей Николаевич является одним из ведущих отечественных специалистов в области дизайна и синтеза низкомолекулярных терапевтических соединений;

тем, что доктор биологических наук, профессор Ширинский Владимир Павлович является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования регуляции

белков путем фосфорилирования, а также механизмов регуляции сокращения и расслабления мышечных клеток;

тем, что доктор биологических наук, профессор Гривенников Игорь Анатольевич является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследований сигнальных процессов в нервных клетках, а также в области нейродегенеративных заболеваний и биологически активных пептидов.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них значительного числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Все три официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Случанко Н.Н.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» в своем положительном отзыве, подписанном главным научным сотрудником, заведующим лабораторией структурной биологии ионных каналов, профессором РАН, доктором физико-математических наук Шенкарёвым Захаром Олеговичем и утвержденном Директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», академиком РАН, доктором химических наук, профессором Александром Габировичем Габировым, указала, что диссертационная работа Случанко Николая Николаевича является завершённой 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.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» является признанным отечественным научным центром в области молекулярной биологии и биохимии и имеет в своем составе несколько подразделений, специализирующихся на исследованиях взаимодействия белков с применением методов структурной биологии. Таким образом, сотрудники Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им.

академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» и, в частности, указанной лаборатории, подписавшей отзыв, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, связанные с тематикой диссертационной работы Случанко Н.Н..

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы Случанко Н.Н. изложены в виде 20 статей в международных рецензируемых журналах и одной главе в книге, входящих в перечень ВАК РФ и индексируемых Web of Science, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. 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. – T. 549. – C. 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. – T. 108. – C. 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. – T. 1854, № 5. – C. 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. – T. 119. – C. 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. – T. 25, № 2. – C. 305-316.
10. **Sluchanko N. N.**, Gusev N. B. Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins // *FEBS J.* – 2017. – T. 284, № 9. – C. 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. – T. 7, № 1. – C. 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. – T. 12, № 6. – C. e0178933.
13. **Sluchanko N. N.** Association of Multiple Phosphorylated Proteins with the 14-3-3 Regulatory Hubs: Problems and Perspectives // *J Mol Biol.* – 2018. – T. 430, № 1. – C. 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. – T. 508, № 4. – C. 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. – T. 166. – C. 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 ζ 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.

Результаты диссертационного исследования Случанко Н.Н. были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных конгрессах (FEBS/EMBO в Париже (Франция) в 2014 г., FEBS в Иерусалиме (Израиль) в 2017 г. (включая форум молодых ученых YSF), FEBS в Праге (Чехия) в 2018 г., FEBS в Кракове (Польша) в 2019 г.), конференциях (EMBO Conference “The biology of molecular chaperones: From molecules, organelles and cells to misfolding diseases” в Санта-Маргарита ди Пула (Италия) в 2013 г.), школах (FEBS “Sofia School for Protein Science: Structure and dynamics of biological macromolecules” в Софии (Болгария) в 2012 г., EMBO Practical Course в Гренобле (Франция) в 2014 г., EMBO Practical Course в Тайпее (Тайвань) в 2015 г., FEBS Practical Course “Advanced Methods in Macromolecular Crystallization VII” в Новые Грады (Чехия) в 2016 г.), а также российских мероприятиях (IV Съезд биофизиков в Нижнем Новгороде в 2012 г., V Съезд биохимиков России в Дагомысе в 2016 г., VII и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» в

Новосибирске в 2015 г. и в Москве в 2017 г., VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии в Санкт-Петербурге в 2018 г.), ежегодной конференции ФИЦ Биотехнологии РАН и лектории кафедры биохимии МГУ им. Ломоносова «Ученые о своей работе» (2019 г.).

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.** 14-3-3 protein chimera with its full-length 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 ζ 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.

В указанных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках диссертации Случанко Н.Н..

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора, академика РАН **Кочеткова Сергея Николаевича** (положительный). Отзыв содержит небольшие замечания относительно оформления работы, которые, как отмечается, не умаляют ее значимости.

Отзыв официального оппонента, доктора биологических наук, профессора **Ширинского Владимира Павловича** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. Обзор литературы с. 55. Автор предполагает, что взаимодействие фосфорилированного полноразмерного В6 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 В6. 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 ретикулума 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 14-3-3b 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 B6 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?

В отзыве указано, что недостатки в оформлении работы малочисленны. На всю рукопись обнаружилось 3-4 опечатки. На рис. 26B 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.

В отзыве отмечается, что высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают ценности и значимости диссертационной работы.

Отзыв официального оппонента, доктора биологических наук, профессора **Гривенникова Игоря Анатольевича** (положительный). Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется, есть небольшие замечания по оформлению списка цитируемой литературы – в нескольких местах отсутствует полное обозначение последних

страниц публикаций. Отмечена неточность в использовании термина «фосфатная группа» в отношении группы, переносимой ферментами протеинкиназами (правильный вариант «фосфорильная группа»).

Отзыв ведущей организации, Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» (положительный). Согласно отзыву, диссертация написана очень хорошим литературным языком и практически не содержит опечаток. Отзыв содержит следующие вопросы и 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 во вводной 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 (γ , ζ , σ) этого белка. Различные типы фосфопептидов впервые упоминаются на стр. 33 автореферата. При этом речь сразу идет о пептиде III-го типа. Отсутствие в вводной характеристике различных изоформ и типов фосфопептидов делает трудным понимание некоторых особенностей работы при ознакомлении с авторефератом.
3. В автореферате работы токсин фузикоцин 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 σ методом гельфильтрации (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 α -кристаллиновый домен белка HSPB6».
- (стр. 56, 57 и стр. 25 автореферат) «фьюжн-конструкции с МВР», должно быть «слитные конструкции с МВР»

В отзыве отмечается, что высказанные замечания не касаются основного содержания рассматриваемой диссертации и не влияют на общую высокую оценку научного уровня и выполненной работы.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Авдонина Павла Владимировича, доктора биологических наук, профессора, руководителя лаборатории физиологии рецепторов и сигнальных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук», замечаний нет.

Клычникова Олега Игоревича, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника кафедры биохимии биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова. Отзыв не имеет замечаний, но содержит вопрос:

«Принимая во внимание количество белка 14-3-3, наличие как минимум нескольких изоформ в одном организме с перекрывающимися специфичностями, вовлеченность 14-3-3 во многие биохимические процессы в разных клетках и органах, возможно ли создание таких лекарственных препаратов, которые целенаправленно действовали бы на специфически выбранный белковый комплекс?»

Митькевича Владимира Александровича, доктора биологических наук, главного научного сотрудника лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук», принципиальных замечаний нет. В качестве незначительного замечания отмечено не совсем верное описание роли рака шейки матки в смертности женщин (стр. 33). В отзыве отмечено, что он не является основной причиной смертности женщин во всем мире.

Польшакова Владимира Ивановича, доктора химических наук, ведущего научного сотрудника факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, замечаний нет.

Семисотнова Геннадия Васильевича, доктора физико-математических наук, профессора, ведущего научного сотрудника, заведующего группой экспериментальных исследований и инженерии олигомерных структур Института белка РАН. В отзыве отмечен ряд незначительных недостатков:

Во-первых, в общей характеристике работы явно не хватает информации о белках семейства 14-3-3 и их изоформах (из каких организмов или тканей взяты гены, степень их гомологии, что представляют собой изоформы, как они определяются или выявляются, почему важны взаимодействия с HSPB6 и т.д.). И хотя из изложения результатов можно что-то понять, это затрудняет чтение.

Во-вторых, в обсуждении результатов, представленных на рис. 3, основное внимание сосредоточено на изменении профиля гель-хроматографии основного пика димера 14-3-3 при взаимодействии с фосфорилированным pB6, и совсем ничего не сказано о наличии низкомолекулярного пика (возможно мономера 14-3-3) и его изменениях (возможного взаимодействия с pB6).

В-третьих, на стр. 21 фраза «В итоге был установлен молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с pB6, включающий несколько этапов (Рис. 12)» слишком категорична, и более уместно было бы «предложить» механизм.

В-четвертых, в подписи к рисунку 26В неплохо было бы указать, какой параметр триптофановой флуоресценции использовался для определения завершенности температурных переходов в белках.

При этом отмечено, что все указанные замечания не портят хорошего впечатления о работе и не влияют на полученные результаты и выводы.

Хайтлиной Софьи Юрьевны, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии РАН», замечаний нет.

С вопросами выступили:

Варламов В.П., Крицкий М.С., Капрельянц А.С., Александров А.И., Безсуднова Е.Ю., Звягильская Р.А., Левицкий Д.И., Дзантиев Б.Б.

В дискуссии приняли участие:

Левицкий Д.И.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие основные результаты:

1. В условиях краудинга, свойственного для цитоплазмы живой клетки, димеры HSPB6 проявляют склонность к самоассоциации, типичной для малых белков теплового шока. Самоассоциации HSPB6 препятствует его фосфорилирование по остатку Ser16 в N-концевом неструктурированном сегменте.
2. Димер HSPB6, фосфорилированный по Ser16, способен взаимодействовать с димерами 14-3-3 за счет связывания фосфорилированной последовательности RRApS16APLP HSPB6 в амфипатической бороздке (АБ) 14-3-3 (микромольная кажущаяся константа диссоциации) при общей стехиометрии связывания 2:2.
3. Неорганический фосфат и глицерофосфаты в миллимолярных концентрациях ингибируют взаимодействие 14-3-3 с фосфорилированным HSPB6 за счет конкуренции за связывание в АБ 14-3-3, причем этот эффект зависит от концентрации анионов. Пирофосфат и сульфат оказывают значительно меньший ингибирующий эффект.
4. Кристаллическая структура комплекса 14-3-3 с фосфорилированным HSPB6, полученная с разрешением 4,5 Å и подтвержденная с помощью структур пептидных комплексов, выявляет структурирование N-концевого сегмента HSPB6 при взаимодействии с 14-3-3. Области контакта белков потенциально применимы для разработки фармакологических соединений (например, миорелаксантов).
5. Ко-экспрессия целевых белков с протеинкиназой А (РКА) в клетках *E.coli* позволяет получать образцы, фосфорилированные по участкам, узнаваемым белками 14-3-3, а наличие отщепляемых аффинных тагов облегчает очистку. В некоторых случаях, ко-экспрессия одновременно с РКА и 14-3-3 обеспечивает получение комплекса 14-3-3 с фосфорилированным белком-партнером (показано для Тау белка).
6. Химерные конструкции, состоящие из 14-3-3 и фосфорилируемых фрагментов нескольких белков-партнеров и ко-экспрессированные с РКА, облегчают получение комплексов с фиксированной стехиометрией, которые легко кристаллизуются и дают структурную информацию о конформации связанного фосфопептида, эквивалентную более трудоемкому и дорогому использованию синтетических фосфопептидов.
7. Мономерная форма 14-3-3, полученная с помощью инженерии димерного интерфейса, показывает сниженную по сравнению с димерным белком термостабильность и устойчивость к протеолизу, но обладает повышенной поверхностной гидрофобностью и шапероно-подобной активностью по отношению к нескольким белкам-субстратам.

8. Мономеризация способствует структурной разупорядоченности N-концевого сегмента 14-3-3, который может быть важен для димеризации и шапероно-подобной активности.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

-Проведено комплексное структурно-функциональное исследование, в результате которого предложен 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 C-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.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

-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.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методы исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность и воспроизводимость полученных результатов не вызывают сомнений;

- выводы диссертации четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты.

Личный вклад соискателя состоит:

- в постановке задач диссертационного исследования;
- в планировании экспериментов;
- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо под его руководством;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных результатов;
- в визуальном представлении результатов работы;
- в написании и подготовке публикаций по теме диссертационного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Случанко Н.Н. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием значительного арсенала современных методов, адекватных поставленным задачам, большим объемом проведенных исследований, и их очевидной научной новизной. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, вполне обоснованы и логически вытекают из представленных результатов, а также подтверждаются публикациями в ведущих рецензируемых журналах (20 статей и 1 глава в книге). Таким образом, данная работа выполнена на высоком методическом уровне, является актуальной для научно-технического развития в области биохимии и соответствует мировому уровню науки.

На заседании 18 февраля 2021 года Диссертационный совет принял решение присудить Случанко Николаю Николаевичу ученую степень доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 13 докторов биологических наук, 5 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета Д 002.247.01.

«За» присуждение ученой степени – 19,

«Против» – нет,

Недействительных бюллетеней – нет.

