

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации
на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 28 октября 2020 г. № 31

О присуждении **Куджаеву Арсену Мизамудиновичу**, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Участие уникального инсерционного домена АТР-зависимой Lon-протеазы из *Escherichia coli* в формировании активной структуры и функционировании фермента» по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия принята к защите 24 августа 2020 г., протокол № 24 Диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН; 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России №75/нк от 15 февраля 2013 г.

Соискатель Куджаев Арсен Мизамудинович, 1990 года рождения, в 2013 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова» по направлению «химическая технология». В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории химии протеолитических ферментов отдела пептидно-белковых технологий ИБХ РАН.

Научный руководитель – доктор химических наук, профессор **Ротанова Татьяна Васильевна**, ведущий научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Демидкина Татьяна Викторовна, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории химических основ биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии

им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук» (ИМБ РАН);

Демидюк Илья Валерьевич, доктор химических наук, доцент, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией функциональной энзимологии Федерального государственного бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ)

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» (ФГБУН ИМБХ), г. Москва, в своем *положительном* заключении, составленном д.б.н., профессором Соловьевой Ниной Ивановной, заведующей лабораторией биохимии и химической патологии белков и к.х.н. Золотцевым Владимиром Александровичем, научным сотрудником лаборатории синтеза физиологически активных соединений, и утвержденном врио директора ФГБУН ИМБХ д.б.н. Пономаренко Еленой Александровной, отметила, что диссертационная работа Куджаева А.М. на тему «Участие уникального инсерционного домена АТР-зависимой Lon-протеазы из *Escherichia coli* в формировании активной структуры и функционировании фермента» является научно-квалификационной работой, которая по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне, безусловно, полностью соответствует критериям (в том числе, п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 8 работ общим объемом 12.7 печатных листов, опубликованных в рецензируемых зарубежных и российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые А. М. Куджаев внес основной вклад, включают:

1. Botos I., Lountos G.T., Wu W., Cherry S., Ghirlando R., **Kudzhaev A.M.**, Rotanova T.V., de Val N., Tropea J., Gustchina A., Wlodawer A. (2019) Cryo-EM structure of

substrate-free *E. coli* Lon protease provides insights into the dynamics of Lon machinery. *Curr. Res. Struct. Biol.*, 1, 13-20. DOI.org/10.1016/j.crstbi.2019.10.001.

2. Rotanova T.V., Andrianova A.G., **Kudzhaev A.M.**, Li M., Botos I., Wlodawer A. Gustchina A. (2019) New insights into structural and functional relationships between LonA proteases and ClpB chaperones. *FEBS Open Bio*, 9, 1536-1551, DOI: 10.1002/2211-5463.12691.

3. **Куджаев А.М.**, Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. (2018) Влияние делеции участка (173–280) инсерционного α -спирализованного домена АТР-зависимой Lon-протеазы *E. coli* на ее функциональные свойства. *Биоорган. химия*, 44 (5), 522-532.

4. **Куджаев А.М.**, Андрианова А.Г., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Ротанова Т.В. (2017) Роль инсерционного α -спирализованного домена АТР-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* в функционировании фермента. *Acta Naturae*, 9, № 2(33), 79-86.

5. Андрианова А.Г., **Куджаев А.М.**, Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. (2017) Участие N-концевой области и характеристического coiled-coil-фрагмента LonA-протеазы из *E. coli* в ее функционировании и поддержании структуры. *Биоорган. химия*, 43 (4), 357-366.

6. **Куджаев А.М.**, Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. (2016) Роль фрагмента (1-106) в функционировании АТР-зависимой Lon-протеазы *E. coli*. *Биоорган. химия*, 42 (4), 421-430.

7. **Куджаев А.М.**, Андрианова А.Г., Серова О.В., Архипова В.А., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. (2015) Влияние мутаций в инсерционном домене АТР-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* на ее функционирование. *Биоорган. химия*, 41 (5), 579-586.

8. Андрианова А.Г., **Куджаев А.М.**, Серова О.В., Дергоусова Н.И., Ротанова Т.В. (2014) Роль α -спирализованных доменов в функционировании АТР-зависимой Lon-протеазы из *Escherichia coli*. *Биоорган. химия*, 40 (6), 673-681.

На диссертацию и автореферат поступили следующие отзывы:

1. **Отзыв официального оппонента д.х.н., профессора Демидкиной Татьяны Викторовны.** Отзыв положительный, содержит следующие вопросы и замечания:

1) хотя в работе встречается минимум англицизмов, считаю неудачным использование термина «фолд» вместо «ход полипептидной цепи»;

2) наряду с использованием названия «мутантная форма» для точечных замен аминокислотных остатков в ферменте часто используется неправомерное для данного случая название «мутант»;

3) в таблице 5 главы «Результаты работы и их обсуждение» следовало указать, для какой длины волны приведен коэффициент молярной экстинкции;

4) в списке цитированной литературы данные для некоторых статей, опубликованных в российских журналах (например, ссылки 102, 111 и другие) приводятся для их английского варианта.

2. Отзыв официального оппонента д.х.н., доцента, профессора РАН Демидюка Ильи Валерьевича. Отзыв положительный, содержит следующие вопросы и замечания:

1) В разделе «Материалы и методы» на стр. 70 при описании условий проведения аналитического ультрацентрифугирования следовало бы указать, помимо скорости вращения ротора (об/мин), еще и радиус ротора. Более корректным было бы заменить данные параметры, как обычно принято, фактором разделения – отношением центробежного ускорения к ускорению свободного падения (g).

2) Результаты, касающиеся модифицированных форм Lon-протеазы из *E. coli* (Ec-Lon), в особенности делеционных, достаточно сложно интерпретировать, так как можно ожидать значительного влияния мутаций на структуру фермента. Это не позволяет сделать однозначных выводов о функциональной роли соответствующих регионов фермента. В идеале нужно было бы проверить, насколько сильно изменяется конформация исследуемых форм фермента. В связи с этим встает вопрос, проводились ли в этом направлении какие-либо эксперименты?

3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, к работе нет замечаний принципиального характера. Содержится пожелание диссертанту «продолжения проводимых исследований и обратить внимание на работу по практической значимости и возможном использовании результатов, в частности, при патологических состояниях».

4. Отзыв на автореферат д.б.н., проф., чл.-корр. РАН Немовой Нины Николаевны – руководителя научного направления ФГБУ науки Карельского научного центра РАН. Отзыв положительный, замечаний нет.

5. Отзыв на автореферат к.б.н. Элпидиной Елены Николаевны – старшего научного сотрудника Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: на представленных графиках не отображены погрешности измерений, а также не ясно, уравнивались ли молярные концентрации Ec-Lon-протеазы и химотрипсина при сравнении протеолитической активности этих ферментов.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации

обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике диссертационной работы. Это подтверждается высоким уровнем их публикаций в ведущих отечественных и международных журналах. Т.В. Демидкина является одним из ведущих специалистов в области энзимологии; ее научные интересы направлены на структурно-функциональные исследования ферментов. И.В. Демидюк известен своими фундаментальными и прикладными исследованиями в области высокоспецифического протеолитического процессинга. Представители ведущей организации занимаются исследованием матриксных металлопротеаз, участвующих во многих биологических процессах как в норме, так и при патологии, а также разработкой потенциальных противоопухолевых агентов. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает новизну результатов, полученных соискателем. В работе доказана двухдоменная организация N-концевой области Ec-Lon-протеазы и впервые охарактеризованы функции обоих доменов, установлена трехмерная структура фрагмента Ec-Lon(235-584) и показано, что полноразмерный фермент представлен смесью гексамеров и додекамеров. Впервые с привлечением метода крио-ЭМ показано, что гексамеры Ec-Lon-протеазы формируют открытые спиральные кольца, характерные для большинства AAA⁺-белков.

Теоретическая значимость исследования заключается в следующем: (1) Совмещение установленной в работе 3D-структуры Ec-Lon(235-584) со структурами фрагментов, полученными ранее, позволило вывести Ec-Lon-протеазу на уровень структурной модели для общего пула LonA-протеаз. (2) Получены доказательства в пользу справедливости ранее выдвинутой гипотезы о том, что инсерционные домены LonA-протеаз подобны α -спирализованным доменам первых AAA⁺-модулей ClpB-шаперонов. В целом, полученные результаты дают новое представление о LonA-протеазах как об особом подклассе в суперсемействе AAA⁺-белков.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что методы и подходы, использованные в работе, могут быть применены при изучении ферментов других подсемейств семейства Lon, в частности, недавно выявленных гибридных LonVA-протеаз. Кроме того, полученные на этом этапе работы сведения могут стать основой для изучения LonA-протеаз как мишеней в

антибактериальной терапии, так как ферменты данного семейства участвуют в процессах, обеспечивающих резистентность микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Оценка результатов исследования выявила, что достоверность экспериментальных данных не вызывает сомнений. Измерения проводились с использованием сертифицированного оборудования, неоднократно воспроизводились и были правильно статистически обработаны. Выбранные методы исследования адекватны поставленным задачам и соответствуют современному уровню научных исследований.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, в обработке и интерпретации полученных результатов. Все экспериментальные данные, представленные в диссертационной работе, получены автором лично, за исключением следующих: структурные исследования с использованием рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии были выполнены под руководством профессора Александра Влодавера (лаборатория кристаллографии макромолекул Национального института рака США); N-концевое секвенирование стабильных фрагментов Lon-протеазы проводилось в Учебно-Научном Центре ИБХ (руководитель – проф. Т.В. Овчинникова); микрокалориметрический анализ Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм был проведен совместно с лабораторией физической химии полимеров Института элементоорганических соединений РАН (руководитель – проф. В.Я. Гринберг); анализ полученных в этих исследованиях данных автор проводил лично. Соискатель лично представлял результаты работы на различных конференциях, принимал активное участие в написании и подготовке к публикации научных статей по результатам диссертационной работы.

На основании вышеизложенного диссертационный совет заключает, что диссертация Куджаева А.М. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят вклад в развитие биоорганической химии и биохимии. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Куджаева Арсена Мизамудиновича «Участие уникального инсерционного домена АТР-зависимой Lon-протеазы из *Escherichia coli* в формировании активной структуры и функционировании фермента», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, соответствует всем требованиям (в том числе п. 9), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650).

На заседании 28 октября 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Куджаеву Арсену Мизамудиновичу ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 6 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации 02.00.10 – биоорганическая химия, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

29 октября 2020 г.

