

119121, гор. Москва, ул. Погодинская, 10, стр.8

тел.: (+7/499) 246-69-80, эл. почта: inst@ibmc.msk.ru, http://www.ibmc.msk.ru

ОКПО 01897373, ОГРН 1027739053792, ИНН/КПП 7704084419 / 770401001, ОКАТО 45286590000

№ 414

«12» октября 2020 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»


Доктор биологических наук
Пономаренко Елена Александровна
«12» октября 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу **Куджаева Арсена Мизамудиновича** «Участие уникального инсерционного домена АТР-зависимой Lon-протеазы из *Escherichia coli* в формировании активной структуры и функционировании фермента», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия

Протеомы клеток любых организмов находятся в постоянной динамике. В ходе жизнедеятельности клеток происходит накопление поврежденных и регуляторных белков. За деградацию этих белков в клетке ответственны АТР-зависимые протеазы, которые вместе с молекулярными шаперонами формируют систему контроля качества белков (СКК). Бифункциональные Lon-протеазы являются представителями АТР-зависимых протеаз. Объектом исследования диссертационной работы является ключевой фермент СКК – мультидоменная Lon-протеаза из

Escherichia coli (Ec-Lon), которая служит модельным ферментом при изучении Lon-протеаз подсемейства A.

К настоящему времени накоплен значительный объем сведений о роли АТР-азного модуля и протеолитического домена в функционировании LonA-протеаз. Однако нет полной ясности о роли некаталитической N-концевой области, в особенности ее инсерционного домена, в структурной организации ферментов и в реализации ими уникальных энзиматических свойств. Нерешенными также остаются вопросы, связанные с взаимодействием LonA-протеаз с нуклеиновыми кислотами.

Таким образом, несмотря на относительные успехи в изучении функции LonA-протеаз, некоторые вопросы, касающиеся структурной организации и механизма действия этих ферментов, во многом не решены и представляют собой весьма актуальную научную задачу.

Диссертационная работа изложена на 160 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов работы и их обсуждения, заключения, основных выводов и списка цитируемой литературы, включающего 181 ссылку. Диссертация содержит 21 таблицу и 81 рисунок.

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также сформулированы цели и задачи исследования.

В обзоре литературы, состоящем из двух крупных разделов, освещено современное состояние вопросов, имеющих непосредственное отношение к теме диссертации Куджаева А.М. Первый раздел посвящен краткому анализу основных типов молекулярных шаперонов СКК и детально рассмотрена доменная организация пептидгидролаз СКК, АТР-азными компонентами которых служат шапероны семейства Hsp100. Во втором разделе обзора подробно описаны протеазы семейства Lon, их структурные и функциональные характеристики. Приведены особенности строения некаталитической N-концевой области LonA-протеаз, наличие которой

является неотъемлемым признаком, отличающим их от других АТР-аз системы контроля качества. Кроме того, обсуждается примечательное свойство LonA-протеаз – способность к связыванию ДНК. Несмотря на имеющиеся данные по взаимодействию ДНК с LonA-протеазой, до сих пор нет полной ясности в идентификации центра/ов взаимодействия LonA-протеаз с ДНК. В заключительной части раздела описана биологическая роль Lon-протеаз, показана важность их участия в таких процессах, как контроль качества и деградация неправильно свернутых белков, регуляция клеточного цикла, споруляция, реакция клетки на стрессовые факторы, осуществление патогенных процессов и др. В заключение автор подводит итоги по обзору литературы, еще раз формулирует цели и задачи диссертационной работы.

Таким образом, подводя итоги, можно сказать, что обзор литературы написан четко и лаконично, проанализирован большой массив информации, приведенные литературные данные выстроены таким образом, чтобы читатель смог понять логику исследования и дальнейшего изложения материала.

Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание всех методик, использованных диссертантом.

Раздел «Результаты работы и их обсуждение» включает 74 страницы и посвящен комплексному изучению N-концевой области Ec-Lon-протеазы. В рамках представленного исследования установлена кристаллическая структура фрагмента (235-584) в разрешении 3.5 Å, включающего три C-концевые спирали инсерционного домена и полный АТР-азный модуль, и показано, что он формирует открытые гексамерные спиральные кольца. Кроме того, с использованием метода криоэлектронной микроскопии, разрешена структура полноразмерного протеолитически неактивного мутанта Ec-Lon-протеазы (разрешение 3.5 Å) и установлено, что данные рентгеноструктурного анализа хорошо согласуются с результатами крио-ЭМ. Полученные структурные данные позволили уточнить границы доменов,

однако пространственная укладка инсерционного домена до настоящего времени остается неразрешенной.

Несмотря на это, совокупность результатов по структурному анализу позволила провести сравнительный анализ охарактеризованных кристаллических структур фрагментов инсерционных доменов Lon-протеаз и молекулярных шаперонов семейства ClpB для проверки гипотезы о LonA-протеазах как об особом подклассе AAA⁺-белков, обладающих структурными характеристиками как белков класса I, так и белков класса II. Согласно этой гипотезе, инсерционный домен LonA-протеаз рассматривается как α -спирализованный компонент потенциального AAA⁺-модуля, гипотетически локализованного аналогично α -спирализованному домену первого АТР-азного модуля ClpB-шаперонов, но утратившего свой нуклеотидсвязывающий домен. В результате сравнительного анализа было показано, что α -спирализованные домены LonA-протеаз и ClpB-шаперонов проявляют выраженное подобие как по первичной, так и по вторичной структуре. Дополнительно при сопоставлении кристаллических структур нуклеотидсвязывающих доменов LonA-протеаз и нуклеотидсвязывающих доменов первого и второго АТР-азных модулей шаперонов ClpA и ClpB, было установлено, что важная для транслокации белковых мишеней консервативная петля GYVG нуклеотидсвязывающего домена LonA-протеаз по пространственному расположению подобна петле GVYG именно второго нуклеотидсвязывающего домена ClpB-шаперонов. Это дает основание предположить, что и предстоящие сопоставленным доменам α -спирализованные домены LonA-протеаз и ClpB-шаперонов также могут проявлять топологическое сходство. Таким образом, полученные в ходе сравнительного анализа данные в пользу справедливости гипотезы вполне логичны и обоснованы.

С целью исследования участия уникального инсерционного домена в функционировании Eс-Lon-протеазы, сконструированы и получены модифицированные формы фермента, несущие точечные мутации и делеции

в N-концевой области, и исследованы их энзиматические характеристики. Установлена важность инсерционного домена для мультимеризации Eс-Lon-протеазы и для реализации ферментом процессивного механизма гидролиза белкового субстрата. Показано, что N-концевой домен обеспечивает конформационную стабильность Eс-Lon-протеазы в классических условиях ее функционирования. Выявлено влияние N-концевого и инсерционного доменов на активность АТР-азного и пептидазного центров фермента. Кроме того, показано, что оба домена N-концевой области Eс-Lon-протеазы не существенны для связывания нуклеиновой кислоты.

Разделы «Заключение и «Выводы» резюмируют полученные автором результаты и сделанные на их основе выводы.

На основании вышеизложенного, можно сделать заключение, что диссертантом проделан большой объем работы, выполненной на высоком научном уровне. А.М. Куджаев успешно решил поставленные перед ним задачи и при этом проявил себя как высококвалифицированный специалист, владеющий широким арсеналом самых современных методов исследования в области генной инженерии, белковой химии и биокатализа. Обсуждение результатов работы отличается ясностью и четкостью изложения, полученные данные являются достоверными, а сделанные выводы – аргументированными и логичными.

В целом, диссертационная работа А.М. Куджаева заслуживает высокой оценки. Представленная работа является частью исследований АТР-зависимых протеаз, проводимых в лаборатории химии протеолитических ферментов. Необходимо подчеркнуть актуальность и важность проводимых работ, направленных на изучение ферментов, ответственных за деградацию поврежденных белков в клетке и входящих в систему контроля качества белков. Следует отметить еще раз высокий научный и методический уровень работы, позволивший решить широкий круг вопросов относящихся к структурной организации и механизму действия Eс-Lon-протеазы, относящейся к АТФ-зависимым протеиназам. К работе нет замечаний


принципиального характера. Хочется пожелать диссертанту продолжения проводимых исследований и обратить внимание на работу по практической значимости и возможном использовании результатов, в частности, при патологических состояниях.

По материалам диссертации опубликованы 8 статей в зарубежных и российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для публикации материалов диссертаций, и 17 тезисов докладов российских и международных конференций. Автореферат правильно и полно отражает содержание диссертационной работы.


На основании проведенного анализа можно заявить, что представленная диссертационная работа Куджаева Арсена Мизамудиновича соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в редакции от 01.10.2018 № 1168), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Отзыв обсужден и принят на заседании лаборатории биохимии и химической патологии белков и лаборатории синтеза физиологически активных соединений (протокол №_1_от 6 октября 2020 г.).

Составители отзыва:

Соловьева Нина Ивановна 
заведующий лабораторией биохимии и химической
патологии белков
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
профессор, доктор биологических наук (по
специальности 03.01.04 – биохимия)

e-mail: nina.solovyeva@ibmc.msk.ru

Золотцев Владимир Александрович: 
научный сотрудник, лаборатория синтеза
физиологически активных соединений
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
кандидат химических наук (по специальности –
02.00.03 – органическая химия)

e-mail: vazolottsev@mail.ru

Адрес места работы: 119121, Россия, Москва,
ул. Погодинская, д. 10, стр.8

Подписи Н.И. Соловьевой и
В.А. Золотцева удостоверяю
Ученый секретарь ИБМХ,
к.х.н.



Карпова Елена Анатольевна