

Отзыв официального оппонента на работу Арсена Мизамудиновича Куджаева  
«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 – Биоорганическая химия».

Ферменты системы контроля качества белков обеспечивают нормальное функционирование клетки, контролируя ее протеом. Объект диссертационной работы А.М. Куджаева - АТР-зависимая Lon-протеаза из *Escherichia coli*. LonA-протеазы играют ключевую роль в системе контроля качества белков в бактериях и эукариотах, участвуя в процессах окислительного стресса, вирулентности и канцерогенеза. Поэтому актуальность диссертационной работы А.М. Куджаева не вызывает сомнений.

Исследования, проведенные в работе А.М. Куджаева, и полученные результаты внесли весомый вклад в понимание взаимоотношения структура – функция такого сложного как в отношении его структуры так и функционирования фермента.

Работа построена по традиционному плану и изложена на 160-ти страницах. В разделе «Введение» четко изложены цели и задачи работы. Раздел «Обзор литературы, составляющий 56 страниц, посвящен структурным характеристикам некаталитических доменов Lon-протеаз и шаперонов. Раздел написан хорошим, ясным языком, очень хорошо иллюстрирован 35-ю рисунками, содержит ссылки на 138 публикаций. Публикация обзора была бы полезна для многих исследователей.

Большой объем выполненных экспериментов и подробный анализ полученных результатов представлены в двух разделах главы «Результаты работы и их обсуждение».

В первом из них проведен анализ первичных и вторичных структур N-концевой области Lon-протеазы из *E. coli* и фермента из других источников. Важным и приоритетным результатом этой части работы было установление пространственной структуры фрагмента Lon-протеазы, содержащего остатки 235-584, включающего C-концевую часть HI(CC)-домена и полноразмерный AAA<sup>+</sup>-модуль. Это позволило определить общий ход NB- и H-доменов фермента и установить, что протомеры упакованы в гексамеры, состоящие из открытых спиральных колец. Другим важным результатом этого раздела было установление трехмерной структуры гексамера полноразмерной мутантной формы фермента – Lon-S679A. Структура определена методом криоэлектронной микроскопии с разрешением 3.5 Å. Она образована открытыми

спиральными кольцами с пятью четко разрешенными протомерами и гибким шестым протомером на периферии. Ввиду большой гибкости участка 1-244 структура полноразмерного HI(CC)-домена осталась неизвестной. Для понимания структурных особенностей и роли HI(CC)-домена фермента далее был проведен анализ первичных последовательностей и кристаллических структур HI(CC)-домена нескольких Lon-протеаз и N1-доменов D1-модулей шаперонов из двух бактериальных источников. Анализ позволил выявить как сходство сравниваемых структур так и их различие. Результатом этого сравнения является установленное сходство топологии NB-домена с NB2-доменом шаперонов ClpB. В целом, данные, полученные в этой части работы, подтвердили высказанное ранее в лаборатории химии протеолитических ферментов гипотезу о том, что LonA-протеазы можно выделить в особый подкласс AAA<sup>+</sup>-белков, сочетающий структурные характеристики белков обоих классов, классов I и II.

Далее в работе был исследован вклад отдельных участков и аминокислотных остатков молекулы фермента в формирование его олигомерной структуры. С этой целью были созданы, получены в высокоомогенном состоянии и охарактеризованы делеционные формы, укороченные формы и четыре мутантные формы Lon-протеазы.

Ранее, по данным электронной микроскопии было установлено, что фермент присутствует в основном в виде гексамеров и додекамеров. Однако использование методов гель-фильтрации и аналитического ультрацентрифугирования показало, что Lon-протеаза существует в растворе в нескольких олигомерных формах (от димеров до гекса- и додекамеров) и в виде ассоциатов и состав раствора зависит от наличия/отсутствия в растворе нуклеотидных эффекторов.

Исследования мутантной формы с тройной заменой в N-домене Lon<sup>EKR</sup> показало, что, в отличие от Lon-протеазы, эта форма существует в основном в виде гексамеров, т.е., замены остатков Glu<sup>34</sup>, Lys<sup>35</sup> и Arg<sup>38</sup> влияют на межсубъединичные взаимодействия фермента, приводя к образованию его додекамерных форм.

Влияние нуклеотидных эффекторов было исследовано для мутантных форм Lon-протеазы с заменами в HI(CC)-домене – ферментов Lon-R164A, Lon-R192A и Lon-Y294A. В отсутствие нуклеотидов эти мутантные формы в основном образуют высокомолекулярные ассоциаты. Наличие ADP или комплекса ADP-Mg по-разному влияет на олигомерное состояние мутантных ферментов. Lon-R164A, кроме мономеров, образует ди- и тримеры, Lon-R192A существует в виде тетрамеров, димеров, октамеров и ассоциатов, Lon-Y294A образует мономерную, тетрамерную и декамерную формы и ассоциаты.

Результаты, полученные в этой части работы, показывают, что инсерционный домен участвует в олигомеризации фермента, необходимой для функционирования Lon-протеазы.

Исследование стабильности полноразмерного фермента и четырех модифицированных форм было проведено методом микрокалориметрии. Были получены и проанализированы кривые плавления трех созданных в диссертационной работе форм фермента - Lon-S679A, Lon-d106-S679A, Lon283 и ранее полученного фрагмента Lon-NP (остатки. S<sup>491</sup>-K<sup>784</sup>), включающий  $\alpha$ -спирализованный и протеолитический домены. Для полноразмерного фермента установлено, что пять доменов субъединицы Lon-протеазы формируют две глобулы. Плавление было исследовано без эффектора - ADP-Mg и в его присутствии, это позволило предположить, что в образовании одной из глобул участвует AAA<sup>+</sup>-модуль фермента. Для укороченной формы Lon-d106-S679A наблюдалась пониженная температура денатурации, не зависящая от наличия или отсутствия ADP-Mg. То есть, N-домен повышает стабильность фермента. Двухдоменный N-концевой фрагмент Lon283 образует в растворе компактную структуру с температурой плавления, намного повышенной по сравнению с другими формами и на нее нуклеотидный эффектор не влияет. Результаты, полученные с применением метода микрокалориметрии, показали, что N-концевая область Lon-протеазы образует высокостабильную трехмерную структуру и взаимодействие AAA<sup>+</sup>-модуля с нуклеотидом приводит к повышению стабильности фермента.

Во втором разделе главы «Результаты работы и их обсуждение» приведены и проанализированы полученные А.М. Куджаевым характеристики АТР-азного и пептидазного центров полноразмерного фермента, его делеционных, укороченных и мутантных форм. АТР-азную активность исследовали в присутствии и отсутствии ионов магния и казеина. Полученные результаты свидетельствуют, что HI(CC)-домен Lon-протеазы обеспечивает эффективное связывание белкового субстрата и участвует в реализации аллостерических взаимодействий в ферменте. Анализ кинетических параметров двух форм фермента с делецией 106-ти и 172-х N-концевых остатков показал, что удаление 106-ти остатков не влияет на связывание белкового субстрата. Мутантные формы Lon-протеазы с заменами потенциально важных остатков в HI(CC)- и N-доменах катализировали расщепление АТР, мутантная форма Lon-R542A была неактивна. Этот результат был неожиданным, поскольку замена топологического остатка R164 на аланин не приводила к неактивной мутантной форме. Этот факт позволяет считать, что конформация фрагментов, включающих эти остатки, отличается и она влияет на АТР-азную активность Lon-протеазы.

Все модифицированные и мутантные формы Lon-протеазы обладали базовой пептидазной активностью. Исследование влияния ионов магния и комплексов Nu-Mg на пептидазную активность показало, что ионы  $Mg^{2+}$  и комплексы Nu-Mg являются активаторами пептидгидролазного центра, свободные нуклеотиды ADP и AMPPNP ингибируют реакцию, а АТФ слабо ее активировывает.

Пептидазную активность Lon-протеазы и ее делеционных и укороченных форм также исследовали в присутствии эффекторов, ионов магния, и комплексов АТФ-Mg, ADP-Mg, AMPPNP-Mg. Для укороченных форм было установлено, что их базовая пептидазная активность не отличается от активности интактной Lon-протеазы (форма Lon-d106), или она незначительно понижена (форма Lon-d172). Базовая активность делеционных форм Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC) оказалась ниже, чем активность интактного фермента, более чем на порядок. Эффекторы не оказывали заметного влияния на активность делеционных форм Lon-dHI(CC) и Lon-d(CC). Это позволило предположить, что HI(CC)-домен и его «coiled coil» участок необходимы эффективного гидролиза субстрата и регуляторного влияния АТФ-азного центра на пептидазный.

Исследование пяти мутантных форм фермента с заменами в N-концевой области показало, что все формы обладают пептидазной активностью и влияние эффекторов на гидролиз субстрата - трипептида оказалось аналогично их влиянию на интактный фермент. Весьма интересным следует считать тот факт, что мутантная форма с заменой критического (как обсуждалось выше) для гидролиза АТФ остатка R542 имела активность выше, чем интактная Lon-протеаза, форма не активировалась ионами магния и комплексом Mg-АТФ, но связывала комплексы Nu-Mg. В тоже время, мутантная форма с заменой топологического остатка R164 обладала пептидазной активностью и влияние эффекторов на нее было аналогично их влиянию на интактный фермент. Этот факт еще раз обнаруживает неравноценность топологических участков полипептидной цепи Lon-протеазы.

Завершает раздел главы «Результаты работы и их обсуждение», описывающей исследования функциональных характеристик Lon-протеазы часть, в которой приводятся данные о гидролизе ферментом и его различными формами казеина, о способности интактного фермента и его форм к автолизу и о взаимодействии Lon-протеазы и ее форм с нуклеиновой кислотой.

Исследование протеолиза казеина и автолиза фермента и его различных форм проводилось без канонических эффекторов и в их присутствии. Полученные результаты показали, что делеции и точечные замены в N-концевой области Lon-протеазы приводят к

конформационным изменениям молекул, проявляющимся в снижении устойчивости фермента к самодеградации. Установлено, что инсерционный HI(CC)-домен необходим для корректного связывания белкового субстрата и гидролиза его по процессивному механизму и N-концевой домен вносит вклад в сохранение конформационной стабильности Lon-протеазы в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ. Определены сайты автолиза фермента и его различных форм. Сайты автолиза в Ec-Lon-протеазе и ее модифицированных формах в основном соответствуют известной специфичности фермента. Полученные в этой части работы данные вносят вклад в понимание роли отдельных доменов фермента в его способности к процессивному гидролизу.

Для ферментов подсемейства LonA-протеаз было известно, что они способны связывать ДНК. Однако вопрос о локализации нуклеотид-связывающего участка оставался открытым. Для Lon-протеазы логичным было предположение, что этот участок может находиться в инсерционном домене. Для подтверждения этого предположения в диссертационной работе была изучена ДНК-связывающая способность Lon-протеазы и ее модифицированных в N-концевой области форм.

В ходе работы было обнаружено, что все препараты Lon-протеазы и ее модифицированные формы содержат до 5 % эндогенной нуклеиновой кислоты с размером фрагментов 150-200 пар оснований. Сравнительным анализом ферментативных свойств Lon-протеазы и фермента (d-eNA-Lon), полученного после освобождения от эндогенной нуклеиновой кислоты, было установлено, что базовая АТФ-азная функция d-eNA-Lon значительно понижена, но остается способной к эффективной активации белковым субстратом. Базовая пептидазная активность d-eNA-Lon, напротив, мало отличалась от активности Lon-протеазы, комплексы Nu-Mg слабо активировали фермент, утративший эндогенную нуклеиновую кислоту, и их действие было сопоставимо с действием ионов магния. По протеолитической активности d-eNA-Lon оказалась подобна недефеционным формам, а интактной Lon-протеазе, поскольку она процессивно расщепляла казеин в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ и подвергалась медленному автолизу в отсутствие эффекторов или при наличии ионов магния. Исследование способности Lon-протеазы и ее модифицированных форм к образованию комплексов с ДНК (плазмида pET28a) показало, что все модифицированные в N-концевой области формы фермента образуют комплексы с плазмидной ДНК. Эксперимент, показавший возможность комплексообразования pET28a с белком Lon283, моделирующим N-концевую область фермента, не подтвердил предположения, что нуклеотид-связывающий участок Lon-

протеазы может находиться в инсерционном домене. Эти данные стимулируют дальнейшие исследования по поиску нуклеотид-связывающего домена фермента.

Приведенные в главе «Результаты работы и их обсуждение» экспериментальные данные очень наглядно иллюстрированы и подробно обсуждены. Выводы, сделанные для каждого из разделов, логически следуют из полученных результатов.

В разделе «Материалы и методы» приводятся данные о методиках выполнения всех экспериментов. Приведенные А.М. Куджаевым описания экспериментов достаточно полны для их воспроизведения, свидетельствуют о том, что диссертационная работа выполнена с применением современных методов физико-химической биологии и о высоком экспериментальном уровне автора.

Результаты диссертационной работы опубликованы в восьми рецензируемых российских и международных журналах, доложены на конференциях, проведенных в Российской Федерации и за рубежом.

Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание.

Результаты работы, без сомнения, будут полезны исследователям, работающим в научных учреждениях, в том числе в Институте биохимии имени А.Н. Баха Российской академии наук, в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии, в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и других.

Несмотря на многочисленные достоинства работы, к числу которых относится и хороший, грамотный язык, которым она написана, ниже приводятся некоторые замечания, касающиеся ее оформления:

- 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.

Диссертация А.М. Куджаева по объёму, уровню выполнения и актуальности полученных результатов полностью соответствует критериям, 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 Арсен Мизамудинович Куджаев, несомненно, заслуживает присвоения степени кандидата химических наук по специальности «02.00.10 – Биоорганическая химия».

Главный научный сотрудник  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук,  
д.х.н, профессор

Татьяна Викторовна Демидкина

119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32  
тел.: +74991359858,  
e-mail: tvd@imb.ru



9-го октября 2020 г.