

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Куджаева Арсена Мизамудиновича** «Участие уникального инсерционного домена АТФ-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

Сложная сеть молекулярных шаперонов и АТФ-зависимых протеаз, формирующих систему контроля качества белков (СКК), постоянно поддерживает и обеспечивает целостность клеточного протеома. Шапероны способствуют правильному фолдингу белков, тем самым предотвращая образование токсичных для клетки агрегатов, а энергозависимые протеазы контролируют уровень регуляторных белков путем их селективного гидролиза и разрушают потенциально опасные внутриклеточные белки.

Типичными представителями энергозависимых протеаз являются LonA-протеазы, составляющие самое крупное из трех известных подсемейств Lon-протеаз (А, В и С), которые играют ключевую роль в функционировании СКК в бактериях и эукариотах. Эти ферменты принимают участие в патогенезе нейродегенеративных болезней, поддержании митохондриального гомеостаза, процессах старения, споруляции, реакциях клетки на стрессовые факторы, а также в проявлении вирулентности многими патогенными бактериями.

Таким образом, изучение структурной организации и функционирования LonA-протеаз является актуальной задачей, решение которой позволит лучше понять их биологическую роль и механизм действия.

Диссертационная работа написана по классическому плану, изложена на 160 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты работы и их обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы, включающий 181 ссылку. Диссертация содержит 81 рисунок и 21 таблицу.

Во Введении сформулированы актуальность темы диссертации, отражены научная новизна и практическая значимость работы.

Обзор литературы состоит из двух частей. В первой части обсуждается система контроля качества белков, включающая молекулярные шапероны и АТР-зависимые протеазы. Описаны структурные и функциональные особенности основных представителей СКК эукариот, бактерий и архей. Вторая часть посвящена описанию семейства Lon-протеаз и их классификации. Подробно рассмотрены особенности строения некаталитической N-концевой области LonA-протеаз, отличающей их от других АТР-зависимых протеаз СКК. Отдельно обсуждается характерное для LonA-протеаз свойство связывать ДНК и биологическая роль этих ферментов. В заключении к разделу автор формулирует цели и задачи диссертационного исследования.

Обзор литературы написан хорошим языком, хорошо проиллюстрирован и заслуживает (при соответствующей доработке) опубликования в качестве обзорной статьи.

В разделе «Материалы и методы» диссертантом приведено подробное описание использованных в работе методов. Раздел написан основательно и подробно. Очевидно, что автор на высоком уровне владеет использованными при выполнении диссертационной работы методами биоорганической химии, биохимии и молекулярной биологии.

Раздел «Результаты работы и их обсуждение» является основным разделом диссертации и включает семь подразделов, а по смыслу может быть разделен на две части. Первая часть посвящена структурному анализу N-концевой области объекта исследования – LonA-протеазы из *E. coli* (Ec-Lon). В настоящее время пространственная структура полноразмерного фермента не известна ни для одной из LonA-протеаз. Есть данные о кристаллических структурах фрагментов ряда ферментов семейства из разных организмов. Однако на момент начала работы эти фрагменты не покрывали структуру ни одного фермента полностью. Поэтому в рамках данной работы методом рентгеноструктурного анализа была впервые установлена структура фрагмента Ec-Lon(235-584). Совокупность этой структуры и структур других фрагментов, ранее решенных в лаборатории химии протеолитических ферментов Института биоорганической химии РАН, покрывает полную последовательность Ec-Lon-

протеазы. Это выводит изучаемый фермент на уровень структурной модели для общего пула LonA-протеаз. В то же время укладка полного инсерционного домена (остатки 124-302) при этом осталась неопределенной.

Впервые представленная в работе структура мутантной по активному центру полноразмерной Ec-Lon-протеазы, определенная с помощью крио-ЭМ с разрешением 3.5 Å, также не позволила прояснить пространственную структуру инсерционного домена, так как гибкий N-концевой фрагмент (1-244) оказался невидимым на картах электронной плотности. Вместе с тем впервые для LonA-протеаз было показано, что в отсутствие субстрата и фрагмент Ec-Lon(235-584), и полноразмерный фермент формируют открытые гексамерные спиральные кольца, характерные для большинства AAA⁺-белков.

Совокупность структурных результатов, полученных для Ec-Lon-протеазы, позволила экспериментально подтвердить факт формирования инсерционного домена восемью α-спиралями и, кроме того, провести проверку ранее выдвинутой гипотезы о LonA-протеазах как об особом подклассе AAA⁺-белков, сочетающих структурные характеристики как белков класса I, так и белков класса II. Сравнительным анализом структур соответствующих фрагментов Lon-протеаз (класс II) и молекулярных шаперонов семейства ClpB (класс I) было выявлено подобие инсерционных доменов ферментов и α-спирализованных доменов первых АТР-азных модулей шаперонов не только по первичной и вторичной структуре, но и по топологическому расположению. При дополнительном сопоставлении фрагментов структур, включающих консервативные тирозин-содержащие GYVG-петли нуклеотидсвязывающих доменов (NB), имеющих ключевое значение для транслокации белковых мишеней в LonA-протеазах и шаперонах ClpB, было выявлено также однозначное совпадение ориентации соответствующих петель у LonA-протеаз и вторых нуклеотидсвязывающих доменов ClpB-шаперонов. На основании этого было сделано заключение, что и предстоящие NB-доменам инсерционные домены LonA-протеаз и α-спирализованные домены первого АТР-азного модуля ClpB-шаперонов могут проявлять топологическое сходство.

Таким образом, в результате проведенного сравнительного анализа кристаллических структур фрагментов LonA-протеаз и Clp-шаперонов получены убедительные аргументы в пользу справедливости гипотезы о LonA-протеазах как об особом подклассе AAA⁺-белков, при этом инсерционный домен ферментов может представлять собой вероятный компонент гипотетического добавочного AAA⁺-модуля.

Вторая часть раздела «Результаты работы и их обсуждение» посвящена функциональным исследованиям Ec-Lon-протеазы. Эта часть начинается с дизайна модифицированных форм Ec-Lon-протеазы. Автор обосновывает выбор делеционных вариантов фермента и остатков, намечаемых для точечных мутаций. Затем А.М. Куджаев описывает получение рекомбинантной Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм. Следует подчеркнуть, что все полученные в диссертационной работе препараты ферментов имеют степень чистоты не менее 95 %.

Далее диссертант освещает проблемы олигомерности AAA⁺-белков и приводит результаты исследования олигомерного состояния интактной Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм с применением методов гель-фильтрации и аналитического ультрацентрифугирования. Показано, что любые изменения в некаталитической N-концевой области и, в особенности, в ее инсерционном домене вызывают снижение степени олигомеризации. Это свидетельствует о важности данного домена для мультимеризации фермента, необходимой для полноценного проявления Ec-Lon-протеазой функциональной активности.

На следующем этапе исследования автор охарактеризовал интактную Ec-Lon-протеазу и некоторые ее укороченные формы с использованием метода микрокалориметрии. При этом было установлено, что изолированная двухдоменная N-концевая область фермента представляет собой компактную структуру с высокой температурой плавления, а делеция N-концевого домена при сохранении инсерционного домена приводит к дестабилизации Ec-Lon-протеазы.

Основной объем раздела «Результаты работы и их обсуждение» занимает собственно функциональное исследование Ec-Lon-протеазы и ее модифицированных форм. Изучены три типа активности: АТР-азная, пептидазная и протеолитическая, а также способность каждой из форм фермента к самодеградации. Установлено, что любые изменения в N-концевой области влияют на функционирование фермента и приводят к нарушению аллостерических взаимодействий между каталитическими центрами. Выявлено значение инсерционного домена фермента для реализации процессивного протеолиза и корректного связывания белкового субстрата. Кроме того показано, что N-концевой домен важен для поддержания конформации Ec-Lon-протеазы в классических условиях ее функционирования, т.е. при сопряжении протеолиза с гидролизом АТР.

Заключительную часть работы автор посвятил изучению возможности выявления ДНК-связывающих центров в интактной Ec-Lon-протеазе и в ее модифицированных формах. При этом было показано, что все очищенные препараты белка содержат примеси ДНК в виде фрагментов размером около 150-200 п.о.; установлено, что связанная эндогенная ДНК способствует корректному функционированию АТР-азного центра фермента; обнаружено, что одноцепочечная и дуплексная формы экзогенного 36-членного олигонуклеотида оказывают разнонаправленное влияние на функциональные центры Ec-Lon-протеазы. Вместе с тем выдвинутое в работе предположение об исключительной роли инсерционного домена Ec-Lon-протеазы в связывании ДНК не подтвердилось.

Таким образом, на основании анализа диссертационной работы можно констатировать, что цели работы, сформулированные автором, достигнуты, а поставленные задачи выполнены. При этом А.М. Куджаев проявил себя как высококвалифицированный специалист, владеющий широким арсеналом современных методов исследований в области биокатализа, геной инженерии и белковой химии. Полученные автором данные являются достоверными, а сделанные выводы – логичными и обоснованными.

Диссертационная работа лишена существенных недостатков, которые могли бы препятствовать ее успешной защите. Тем не менее, в отношении работы можно сделать несколько замечаний.

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 Ec-Lon-протеазы, 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?

Хотелось бы добавить, что важным достоинством обсуждаемой работы является то, что она развивающаяся. Мы видим в диссертации А.М. Куджаева один из завершенных этапов исследования, который, однако, не дает ответов на многие вопросы о структурно-функциональной организации LonA-протеаз. В то же время полученные на этом этапе результаты являются основой для продолжения исследования, в рамках которого должна быть получена недостающая информация, позволяющая собрать воедино имеющиеся данные о структуре и функциях Ec-Lon-протеазы, что, в свою очередь, даст возможность приблизиться к пониманию биологических функций Lon-протеаз.

Следует подчеркнуть, что высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают ценности диссертационной работы. Диссертация А.М. Куджаева представляет собой законченное научное исследование. Актуальность полученных данных и высокий методический уровень работы не вызывают сомнений. Основные результаты

диссертационного исследования опубликованы в зарубежных и российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для публикации материалов диссертаций, и тезисах докладов российских и международных конференций. Автореферат диссертационной работы полностью отражает содержание выполненной работы.

На основании вышеизложенного следует сделать заключение, что диссертационная работа Куджаева Арсена Мизамудиновича 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 сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Официальный оппонент:

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)

Адрес места работы: 123182, Россия, Москва,
площадь академика И.В. Курчатова, д. 2
Тел.: +7 (499) 196-18-53, e-mail: duk@img.ras.ru

Подпись д.х.н. И.В. Демидюка заверяю.

Заместитель директора НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ,

д.б.н., проф.



Сломинский Петр Андреевич

12 октября 2020 г.