

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01
28 октября 2020 года

Защита диссертации **Куджаева Арсена Мизамудиновича** на тему:
«Участие уникального инсерционного домена АТР-зависимой Lon-протеазы
из *Escherichia coli* в формировании активной структуры и функционировании
фермента»

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия

Москва – 2020

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 28 октября 2020 года.

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

1.	Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
3.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
4.	Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
5.	Академик РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
6.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
7.	Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
8.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
9.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
10.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
11.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
12.	Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
13.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
14.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
15.	Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
16.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(02.00.10)
17.	Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
18.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
19.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)
20.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

Иванов В.Т., председатель: дорогие коллеги, доброе утро! Мне докладывают, что у нас есть все основания приступить к работе нашего защитного ученого совета. Спасибо всем тем, кто пришел, несмотря на сложное время, нашел возможность прийти и поработать, к счастью, в обширном помещении, выполняя все положенные правила санитарной безопасности. У нас предлагается повестка дня, состоящая из двух защит и приема к защите новой диссертации, утверждения оппонентов и нескольких формальных шагов. Довольно плотная повестка дня, но не в первый раз мы такие повестки дня реализуем, я думаю, сейчас нет причин выражать сомнения. Переходим к делу. Нет возражений? Нет возражений. Итак, первая защита. Куджаев Арсен Мизамудинович. Владимир Александрович, материалы личного дела.

Олейников В.А., ученый секретарь: *(зачитывает информацию о соискателе и документах, содержащихся в личном деле соискателя)*. Да, значит, Куджаев Арсен Мизамудинович, гражданин Российской Федерации, окончил «Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова» в 2013 году по направлению «химическая технология». С 2012 года по 2020 год – инженер, с февраля 2020 года по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов нашего института. Кандидатский экзамен по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия сдан с оценкой «отлично». Работа выполнена в лаборатории химии протеолитических ферментов нашего института. Научный руководитель диссертационной работы – д.х.н., профессор Ротанова Татьяна Васильевна, ведущий научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов. И по теме диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно, 24 августа 2020 года. И все необходимые документы в деле имеются.

Иванов В.Т., председатель: вполне гладкая преамбула, есть какие-нибудь вопросы, уточнения? Не вижу. Тогда слово диссертанту, Арсен Мизамудинович, 20 минут для доклада.

Куджаев А.М., соискатель: *(излагает основные положения диссертационной работы)*.

Иванов В.Т., председатель: у вас все, да?

Куджаев А.М., соискатель: если позволите, я не зачитаю выводы.

Иванов В.Т., председатель: все в ваших руках, я считаю, что можно остановиться на этом.

Куджаев А.М., соискатель: спасибо. Здесь представлен список работ по теме диссертации и материалы научных конференций. Спасибо за внимание.

Иванов В.Т., председатель: Переходим к обсуждению. Вопросы к докладчику. Прошу. Давайте к микрофону, чтобы все было стенографировано.

Белогуров А.А.: Да, у меня к вам такой вопрос. Вы в начале доклада упомянули, что в структуре Lon-протеазы есть консервативная петля с тирозином, которая, собственно говоря, участвует в транслокации субстрата. Мой вопрос следующий: это действительно похоже на структуру 26S протеасомы и ее АТР-азного домена, АТР-азного гексамера, который также содержит очень похожие тирозиновые остатки, которые выстраиваются в виде спирали и, действительно, транслоцируют субстрат внутрь уже цилиндра 20S протеолитического ядра. Может быть, я не совсем разобрался в структуре Lon-протеазы, но я не совсем понимаю, зачем в случае Lon-протеазы есть эти остатки и куда транслоцировать субстрат, если, собственно говоря, вы показали, что это незамкнутый гексамер, вот по криоэлектронной микроскопии.

Куджаев А.М., соискатель: Да, я понял вопрос. По криоэлектронной микроскопии показано, что она формирует открытые спиральные кольца, но сделано это в отсутствие комплекса АТР-Mg, поэтому там, в принципе, невозможно образование закрытого гексамера. Вообще да, это все устроено наподобие протеасом, происходит связывание субстрата, его транслокация с использованием консервативных петель тирозин содержащих, и все попадает в протеолитическую камеру, где происходит исчерпывающая деградация субстрата, т.е. все происходит только в присутствии комплекса АТР-Mg. То есть именно при формировании функционального гексамера.

Белогуров А.А.: Можно еще тогда?

Иванов В.Т., председатель: Конечно.

Белогуров А.А.: Но тогда у меня вопрос, а почему вы не сделали криоэлектронную микроскопию, допустим, в присутствии АТР и магния или негидролизуемого аналога, чтобы как раз увидеть этот гексамер.

Куджаев А.М., соискатель: ну да, можно было сделать, но, к сожалению, пока что это начальный этап работы и еще не все сделано по криоэлектронной микроскопии. Мы только начали работать в этом направлении. Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: еще вопросы?

Завриев С.К.: можно такой, чисто технический вопрос?

Иванов В.Т., председатель: можно любой вопрос, вот микрофон.

Завриев С.К.: чисто технический вопрос, я вот смотрю на автореферат, у вас тут нет ни выводов, ни списка статей.

Куджаев А.М., соискатель: почему? Есть все там.

Завриев С.К.: ну вот в том экземпляре, который у меня, нету.

Куджаев А.М., соискатель: я вот не знаю, честно говоря.

Олейников В.А., ученый секретарь: может страничка выпала? На самом деле вот.

Куджаев А.М., соискатель: может выпала?

Иванов В.Т., председатель: технический нюанс.

Куджаев А.М., соискатель: я, к сожалению, не все авторефераты посмотрел и поэтому не могу сказать.

Олейников В.А., ученый секретарь: получите другой, да.

Олейников В.А., ученый секретарь: скажите, а вот можно как-то чуть пошире сказать про электронную микроскопию. Где делали, на каком приборе, как готовили образцы?

Куджаев А.М., соискатель: на каком приборе не скажу, это делалось под руководством профессора Влодавера в лаборатории кристаллографии макромолекул Национального института рака и ...

Олейников В.А., ученый секретарь: это в Москве у нас?

Куджаев А.М., соискатель: нет, в Соединенных штатах Америки. Да, я непосредственно сам не принимал участие в этом, но могу сказать, что криоэлектронная микроскопия сделана только для полноразмерного фермента в присутствии ионов магния. На этом все.

Олейников В.А., ученый секретарь: и про программы обработки вы тоже ничего не скажете?

Куджаев А.М., соискатель: Нет, к сожалению.

Иванов В.Т., председатель: скажите, вы показали, что связывание ДНК важно для нормального функционирования вашей протеазы, но вы не выявили специфических участков взаимодействия протеазы с ДНК. Может какие-то предположения есть, хотя пока экспериментально не удастся, может есть какие-то идеи, теории?

Куджаев А.М., соискатель: ну, взаимодействие Lon-протеазы с ДНК скорее всего неспецифическое, потому что до сих не найдены сайты Я позволю себе слайд. Вот тут

показано распределение зарядов на молекуле Lon-протеазы полноразмерной, модели. И вот, в данной статье конкретно рассматривается АТР-азный модуль, так как они получили разные фрагменты, то есть N-концевой домен отдельно, АТР-азный модуль и протеолитический домен. И показали, что ни N-концевой, ни протеолитический домены не связывают ДНК, а вот АТР-азный модуль как раз-таки участвует. Они нашли заряженные остатки в линкерной области между N-концевым доменом и 3A-модулем. Показали, что связывание есть, но оно, скорее всего, неспецифическое. Судя по нашим результатам, оно везде связывается: и в N-концевой, и в АТР-азной и в протеолитической. То есть, оно, скорее всего, неспецифическое и в этом как-то вся молекула участвует.

Иванов В.Т., председатель: идея понятна.

Куджаев А.М., соискатель: то есть, специфических сайтов не найдено. Их может и не быть.

Иванов В.Т., председатель: идея понятна. Прошу. У вас есть вопрос или вопросы иссякли?

Олейников В.А., ученый секретарь: Иван Витальевич, вы спросить хотели что-то?

Смирнов И.В.: нет-нет, мы обсуждаем.

Иванов В.Т., председатель: мы увидели вашу поднятую руку и поэтому решили, что вы хотели вопрос задать.

Олейников В.А., ученый секретарь: а вот насчет этих картинок, это действительно электростатика или это фильность-фобность карта?

Куджаев А.М., соискатель: электростатика.

Иванов В.Т., председатель: по-видимому, вопросы иссякли. Спасибо, можете ненадолго отдохнуть. Дальше по процедуре слово предоставляется научному руководителю. Татьяна Васильевна, есть желание характеризовать диссертанта?

Ротанова Т.В.: Арсен пришел к нам в лабораторию студентом 4-го курса и он, конечно, в это время не имел никаких навыков экспериментальной работы. В нашей лаборатории он выполнил бакалаврскую и магистерскую работы и защитил их успешно. Приобрел очень много новых знаний. Арсен очень открыт, он обладает такой способностью стремиться узнать много нового, овладеть новыми подходами, методами, узнать много новых направлений в своей экспериментальной работе. После этого, конечно, он поступил в аспирантуру, где, в общем-то, приобрел те знания, которых ему не доставало после окончания МИТХТ. И вот теперь он представляет свою работу к защите. Арсен отличается

очень таким твердым характером, он всегда собран, он крепкий, надежный, честный человек, на которого всегда можно положиться. И это его качество характеризует его и как научного сотрудника, и как человека, и как коллегу. Мы всегда считаем, что нам повезло, что Арсен пришел в нашу лабораторию и стал ее сотрудником. Я считаю, что он очень достойный кандидат на присвоение ему звания кандидата химических наук. Все.

Иванов В.Т., председатель: спасибо. Далее у нас серия отзывов, с которыми мы должны ознакомиться.

Олейников В.А., ученый секретарь: так, отзывы. *(Излагает заключение организации, где выполнялась диссертация)*. Во-первых, заключение организации, где выполнялась работа. Работа выполнялась в нашем институте, Институте биоорганической химии, в лаборатории химии протеолитических ферментов, ну естественно, тут биографические данные, о которых мы слышали, о которых мы говорили. Очная аспирантура нашего института, далее сдача кандидатских экзаменов, удостоверение выдано в 2020 году, тема диссертационной работы утверждена на заседании ученого совета нашего института 15 июля 2020 года, руководитель Татьяна Васильевна Ротанова, которую мы только что слышали. Ну и дальше на этом заседании, в этом заключении говорится следующее. Ну, во-первых, по поводу актуальности темы и направленности исследования, что тема актуальна и подтверждается это. Личное участие автора, личный вклад Куджаева в представленную диссертационную работу заключался в сборе и анализе литературных данных, в планировании проведении научных экспериментов, в обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций. Достоверность. Достоверна. Новизна. Оригинальная работа. Практическая значимость, опять же подчеркивается, что это достаточно важная значимость. Специальность соответствует специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах, здесь приводятся список работ Куджаева, их восемь. Результаты проведенных исследований. Здесь установлена трехмерная структура фрагмента, осуществлен дизайн и получены девять новых делеционных и мутантных форм фермента ну и т.д. Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что работа является законченной, в которой содержится решение актуальных проблем, имеющих существенное значение для развития биоорганической химии и, в целом, диссертация удовлетворяет требованиям, предъявляемым к диссертационным работам, и, соответственно, она прошла проверку на оригинальность на отсутствие заимствований, и, в целом, эта работа рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. И соответственно, принято на семинаре отдела пептидно-

белковых технологий, присутствовало 29 человек, за – 29, против, воздержавшихся нет. Протокол, соответственно, подписан председателем семинара Вадим Тихоновичем Ивановым и зам. директора ИБХ РАН Ильей Викторовичем Ямпольским. Утверждено директором нашего института, академиком Александром Габибовичем Габибовым. Это что касается заключения организации.

Далее отзыв ведущей организации. (*Излагает отзыв ведущей организации*). Ведущая организация – Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени Ореховича, и, соответственно, отзыв полностью положительный, опять же подчеркивается актуальность, пишется следующее, бифункциональные Lon-протеазы являются представителями АТФ-зависимых протеаз. 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. Изложена диссертация на 160 страницах, ссылок 181, соответственно, таблицы и рисунки. Введение. Обоснована актуальность диссертационной работы. В обзоре литературы, пишется конкретно, 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. Материалы и методы. Детальное описание всех методик, использованных диссертантом. «Результаты работы и их обсуждение» включает 74 страницы, посвящен комплексному изучению N-концевой области Ec-Lon-протеазы. В рамках представленного исследования установлена кристаллическая структура фрагмента (235-584) с разрешением 3.5 ангстрема. С использованием метода криоэлектронной микроскопии разрешена структура полноразмерного протеолитически неактивного мутанта опять же с разрешением 3.5 ангстрема. Установлено, что данные рентгеноструктурного анализа хорошо согласуются результатами криогенной электронной микроскопии. Ну далее достаточно подробно излагается то, что мы сегодня слышали. С целью исследования участия уникального инсерционного домена в функционировании Lon-протеазы сконструированы и получены модифицированные формы фермента, несущие точечные мутации и делеции в N-концевой области, исследованы их энзиматические характеристики. Выявлено влияние N-концевого инсерционного домена на активность АТФ-азного и пептидазного центров фермента. Разделы «Заключение» и «Выводы» резюмируют полученные автором результаты, сделанные на их основе выводы, то есть резюмируя, проделан большой объем работы, работа выполнена на высоком научном уровне, обсуждение результатов отличается ясностью и четкостью изложения, полученные

данные являются достоверными, а сделанные выводы аргументированными и логичными. В целом, диссертационная работа заслуживает высокой оценки. К работе нет замечаний принципиального характера. Хочется пожелать диссертанту продолжения проводимых исследований, обратить внимание на работу по практической значимости и возможном использовании результатов, в частности, при патологических исследованиях. Ну здесь подчеркивается, что изложены и опубликованы 8 статей, 17 тезисов. Автореферат правильно и полно отражает содержание диссертационной работы и, соответственно, подчеркивается, что эта работа соответствует критериям, установленным положением присуждения ученых степеней, а ее автор, несомненно, заслуживает присвоения 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 6 октября 2020 года. Составители отзыва: Соловьева Нина Ивановна, заведующая лабораторией биохимии и химической патологии белков и Золотцев Владимир Александрович – научный сотрудник лаборатории синтеза физиологически активных соединений. Отзыв утвержден врио директора Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени Ореховича, доктором биологических наук Пономаренко Еленой Александровной. Ну, то есть, без замечаний.

Иванов В.Т., председатель: там нет замечаний, поэтому нет необходимости отвечать на те пожелания, которые там были на будущее. Есть ли отзывы на автореферат?

Олейников В.А., ученый секретарь: да, поступило два отзыва на автореферат. *(Излагает отзывы на автореферат)*. Оба отзыва положительные. Ну первый отзыв. Рассматриваемая работа представляет собой законченное научное исследование, результаты работы вносят вклад в разработку новых подходов к выявлению патологических нарушений, вызванных накоплением в организме поврежденных белков и, соответственно, диссертация соответствует, а автор заслуживает присвоения степени кандидата наук. Подписано, руководитель научного направления ФГБУ науки Карельского научного центра, доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН Нина Николаевна Немова. Это Карельский центр. И, соответственно, второй отзыв на автореферат тоже он весь положительный, тоже подчеркиваются положительные стороны. Пишется, что Куджаев успешно решил поставленные в работе задачи, полученные автором в работе данные являются достоверными, сделанные выводы аргументированы и логичны. Но, замечания, по автореферату можно отметить, что на представленных графиках не отображены погрешности измерений, а также не ясно, уравнивались ли молярные концентрации *Escherichia coli* Lon-протеазы и химотрипсина при сравнении протеолитической

активности этих ферментов. Однако, эти замечания не снижают общей высокой оценки работы. Соответственно, диссертация соответствует, а сам автор заслуживает. Подписано, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИИ физико-химической биологии имени Белозерского МГУ имени Ломоносова, Элпидина. Все.

Иванов В.Т., председатель: там были замечания. У вас есть желание ответить на них? Есть, спасибо.

Куджаев А.М., соискатель: Хотел бы поблагодарить Нину Ивановну Соловьеву и Владимира Александровича Золотцева за пожелания сделанные, которые я, постараюсь в дальнейшем учесть при работе над Lon-протеазой. Также хочу поблагодарить Нину Николаевну Немову за положительный отзыв на автореферат. Также благодарен Елене Николаевне Элпидиной за отзыв на мой автореферат. И касаясь относительных погрешностей измерений, не приведенных на графиках, то они даны в таблицах по энзиматической активности Lon-протеазы и ее модифицированных форм. Молярные концентрации Lon-протеазы и химотрипсина уравниваются без учета концентраций активных центров ферментов. Вроде все.

Иванов В.Т., председатель: все у вас?

Куджаев А.М., соискатель: да.

Иванов В.Т., председатель: спасибо. Мы должны перейти к более объемным отзывам, отзывам официальных оппонентов. Начнем с Ильи Валерьевича Демидюка, Институт молекулярной генетики, профессор, заведующий лабораторией.

Демидюк И.В., оппонент: *(излагает положительный отзыв)* уважаемый председатель, уважаемые члены совета, уважаемые коллеги. Мне кажется, сейчас уже всем понятно, что протеазы — это не просто устройство для разрушения белков, протеазы — это регуляторные ферменты и в каждом живом организме, в каждой клетке протеазы гидролизуют множество белков и пептидов и, таким образом, регулируют разнообразные процессы. Если смотреть на протеолитическую систему как на регуляторную, то это, пожалуй, одна из самых обширных регуляторных систем, в каждом геноме два-три процента генов — это гены протеолитических ферментов и больше только транскрипционных факторов. Ну и, конечно, как всякая регуляторная система, протеолитическая система в клетках тоже строго регулируется. Соответственно, АТФ-зависимые протеазы — это такой яркий хороший пример таких регуляторных регулируемых протеаз, и я не буду распространяться вообще про АТФ-зависимые протеазы, в этой

аудитории, чтобы понять, о чем идет речь, наверное, мне будет достаточно сказать одно слово в качестве примера - это слово протеасома. Теперь к Lon-протеазам. Это такой особый класс, отдельная группа АТФ-зависимых протеаз, которые есть, как вы слышали это в докладе, у эукариот и у бактерий. У эукариот это, в основном, или в первую очередь, митохондриальные белки и те данные, которые есть о Lon-протеазах в настоящее время, они абсолютно четко показывают, что, кроме того, что эти ферменты участвуют в контроле качества, про что говорил Арсен Мизамудинович, то есть удаляют из клетки неправильно свернутые, несвернутые, поврежденные белки, окисленные белки, эти ферменты еще участвуют в регуляции клеточного метаболизма более тонко. И то, что сейчас, в общем особо обсуждается выходит на первый план, что было в докладе и в вопросах звучало – это как раз то, что по-видимому, Lon-протеазы участвуют каким-то образом в метаболизме ДНК. В митохондриях они ассоциированы с митохондриальной ДНК, в бактериях активность Lon-протеаз меняется в зависимости от репликации, от активности репликации, связанных с фазами бактериального роста, многие субстраты, белковые субстраты Lon-протеаз и это не неправильно свернутые белки, а вполне себе нативные, это ДНК-связывающие белки, предполагается, что Lon-протеазы каким-то образом узнают или активность их регулируется повреждениями ДНК, предполагается, что Lon-протеазы регулируют, а их активность, как слышали в докладе, регулируется связыванием с ДНК и, возможно, с РНК и, по-видимому, опять-таки, в основном, это все предположения. По-видимому, Lon-протеазы участвуют в регуляции репликации и вероятно транскрипции. Но, вот, Lon-протеазы исследуют довольно долго, больше 40 лет и много что понятно, но в то же время многие вопросы остаются невыясненными. И непонятно, например, как Lon-протеазы выбирают субстраты, непонятно как ДНК влияет на самом деле на активность, непонятно, где она связывается ДНК, непонятно насколько важно взаимодействие с РНК для регуляции Lon-протеаз и непонятно, на самом деле, до конца как взаимодействуют каталитические домены, АТФ-азный и протеолитический, в значительной степени это непонимание связано с тем, что, с одной стороны – не изучены пространственная структура в достаточной степени этих белков, то есть до сих пор нет ни одной пространственной структуры полноразмерной Lon-протеазы. И, с другой стороны, это связано с тем, что интерес и активность исследователей за все эти 40 лет в большей части была сконцентрирована как раз на каталитических доменах, на протеолитическом, на АТФ-азном, а вот эти некаталитические домены, собственно, которым посвящена обсуждаемая нами работа они в значительной степени оставались за кадрами. Из этой ситуации, которая есть сейчас с Lon-протеазами, и вытекает идея представленной нам сегодня работы, и, в общем, идея эта заключается в том, чтобы на самом деле понять молекулярный механизм

функционирования этого фермента, который должен стать важным элементом для понимания собственно физиологических функций этих ферментов. И эта ситуация опять-таки диктует ту структуру работы, которую мы сегодня видели, в ней две части – это структурная часть и функциональная. Значит, структурная часть, она собственно, направлена на самом деле на то, чтобы решить структуру полноразмерного фермента. И, поскольку, неоднократно уже предпринимались такие попытки с использованием традиционного метода рентгеновской кристаллографии, эти попытки до сих пор не были успешными, то в этой работе использован тот подход, который сейчас применяется для установления структуры сложных белковых, ну и не только белковых комплексов. Соответственно, комбинация криоэлектронной микроскопии и рентгеновской кристаллографии. Ситуация такая, опять мы слышали это в докладе, что можно получить структуры отдельных модулей или доменов Lon-протеаз, и они для многих Lon-протеаз получены, но на момент начала этой работы не было ни одного фермента, последовательность которого была бы закрыта вот этими кусками кристаллической структуры. Соответственно, это первое, что было сделано в этой работе и, таким образом, LonA-протеазы из E.coli, которые являются в этой работе объектом исследования, стала первой Lon-протеазой, в которой вся последовательность закрыта структурами, как я сказал. Дальше вполне логично второй шаг, параллельно сделанный – это криоэлектронная микроскопия и здесь, соответственно, был получен в общем очень интересный результат на самом деле – это первая структура LonA-протеазы без субстрата, и мы видим вот этот открытый комплекс, который здесь обсуждался и, соответственно, но вот эта ситуация была в данной работе ну, то есть, этот факт был установлен в этой работе впервые, хотя для других этих 3A+-белков похожие структуры есть. И соответственно, это само по себе является важным результатом, потому что позволяет уже выстраивать какие-то предположения о том, как работают Lon-протеазы и, соответственно, как, ну формулирует какие-то гипотезы, которые в дальнейшем могут быть проверены. Но, к сожалению, как опять мы слышали, не удалось совместить рентгеноструктурные и криомикроскопические данные, потому что, ну это особенности объекта, который исследуется, потому что есть подвижные регионы, это ровно тот регион, который больше всего интересовал диссертанта и, несмотря на это, то что сделано оно в общем определяет дальнейшие шаги и в общем понятно ну по крайней мере примерно, что нужно дальше делать и, как я понял из обсуждения с Арсеном, соответственно, эти шаги уже предпринимаются. Теперь вторая часть, как бы функциональная и она такая обычная стандартная белково-инженерная история, когда берется белок он модифицируется и модифицированные формы изучаются с точки зрения функциональных свойств и здесь вот первое что как бы я хотел отметить это

очень большой объем работы, который проделан в этой части. Всякий, кто работал с рекомбинантными белками знает, что, когда мы модифицируем белок даже вводя точечные мутации, мы можем получить сильно измененные свойства белка и это диктует существенные изменения условий, способов работы с этим белком, изменением методов очистки ну и т.д., и т.д. И соответственно, в этой работе мы видели схему, я не посчитал вот так вот скрупулезно, ну около полутора десятка модифицированных форм Lon-протеазы было получено. Для каждой формы мало этого было исследовано достаточно большой спектр активностей: АТФ-азная, протеолитическая и пептидазная, связанная с ДНК, олигомерная организация была исследована способность к агрегации вообще наверняка что-то забыл. В общем, в этой части работы, с одной стороны, как я уже сказал, приложен очень большой труд, с другой стороны видно, что он, соответственно, для того чтобы сделать это, нужна высокая квалификация, как белкового инженера, как биохимика, и как энзимолога, соответственно, это свидетельствует как раз о вот этой самой квалификации Арсена Мизамудиновича. Но это техническая сторона, как бы желание было понять, как работает и какую функцию выполняют вот эти N-концевые домены, в первую очередь, вот этот уникальный инсерционный, уникальный для Lon-протеаз инсерционный домен, и соответственно, на самом деле разобраться вот с этим в общем-то не получилось. Однако, ну опять это связано со сложностью объекта, отсутствием структуры в значительной степени и, однако, были получены данные, указывающие на то, ну в каких что ли функциях вероятно важен вот этот самый инсерционный N-концевой домен. И, собственно, это закладывает такую хорошую основу для продолжения работы. Вообще я хотел бы здесь отметить, как бы отдельно подчеркнуть, что мне кажется важным достоинством этой работы является то, что она развивающаяся, то есть мы видим на самом деле некий первый этап исследования, этап на котором создается база для того, чтобы прийти ровно к решению той задачи, которую я сформулировал. Она кстати не сформулирована как цель конкретного исследования, ну потому что она достаточно амбициозная. Цель, задача – разобраться с тем, как работает фермент, каков молекулярный механизм работы этого фермента и, вот то что сделано сейчас, как в плане структурном, так и функциональном. Это с одной стороны позволило получить данные, которые необходимы для дальнейшего развития работы с точки зрения формулирования каких-либо адекватных гипотез о том, как все это функционирует и, с другой стороны, создал экспериментальную базу, в первую очередь, это вот эти наборы рекомбинантных белков, систем экспрессии рекомбинантных белков, схем очистки и методов характеристики, которые позволяют эти гипотезы проверять и соответственно двигаться в сторону решения поставленной задачи. Теперь несколько слов о рукописи, собственно о самой диссертации. Очень часто, когда читаешь диссертации, то

обращаешь внимание на то, что там есть грех в представлении данных и отзывы на диссертации часто содержат такие большие блоки, в которых перечисляются там формальные некие вот эти вот ошибки, вплоть до грамматических диссертантом. Вот в данном ничего такого нет. Диссертация очень тщательно оформлена, очень хорошо написана, там почти нет у меня каких-то вот таких формальных чисто технических замечаний. Хорошо проиллюстрирована и, соответственно, это действительно производит очень хорошее впечатление. Литобзор. Отдельная вещь. Он посвящен АТФ-зависимым протеазам и акцентирован на некаталитических доменах и на Lon-протеазах, что тоже вполне естественно и я прочитал его с большим интересом и, соответственно, думаю, что при соответствующей доработке, прежде всего, что касается иллюстративного материала, этот обзор может быть опубликован как отдельная статья. Так, теперь, наверное, о недостатках. Я хотел бы отметить две вещи, одна в общем частная, достаточно формальная техническая хотя и важная. Это касается представления условий центрифугирования прежде всего ультрацентрифугирования. В работе этот метод используется для изучения олигомерного состояния разных вариантов LonA-протеазы в числе других и, когда описываются эти условия, то Арсен Мизамудинович приводит только скорость вращения ротора, естественно это не дает представления об условиях центрифугирования и не позволяет воспроизвести эксперименты, поскольку фактор разделения зависит не только от скорости вращения ротора, но и от его геометрии. Соответственно, было бы правильным привести результаты, как это обычно принято, используя фактор разделения, выраженный в g. Ну это техническое замечание, как я сказал, а второе замечание, наоборот, оно такое достаточно общее и философское. Когда мы работаем с белками, модифицируем их, потом изучаем какие-то свойства, мы должны быть очень осторожными в интерпретации вот этих результатов, потому что всегда есть такая опасность, сконцентрировавшись на каком-то конкретном свойстве или ограниченной группе свойств, потерять из виду другие что ли свойства, другие влияния введенных модификаций. Ну, то есть, например, сильно может измениться структура белка, это может повлиять на свойства негативно, и это не будет значит, что на самом деле есть какая-то специфическая взаимосвязь между модифицируемым регионом белка и тем свойством, которую мы изучаем. Ну, возможно, я немного путанно это объяснил, но я говорю о том, что это очень хорошо иллюстрирует известная всем байка про тараканов, которые слышат ногами. И, соответственно, в случае, почему это философский вопрос? Потому что, когда мы изучаем любой объект, мы неизбежно на него влияем. Влияя на объект, мы меняем этот объект и изучаем не тот объект и с этим, по-видимому, нельзя ничего сделать, эта проблема не решается но, в наших естественных науках мы пытаемся это обойти ставим многочисленные контроли и приходя

к одним и тем же выводам, используя разные методические подходы, вот, и в случае белков обычно, когда белки модифицируются в таком, к примеру, ключе, как это было в этой работе, стараются, по крайней мере, отслеживать какие-то драматические и очень сильные изменения в структуре белков, то есть, если структура белка сильно меняется, то наверное есть опасность, что просто мы белок сломали и никакого специфического взаимодействия, специфического эффекта в той области, то свойство, которое нас интересует не вносит особенно, если влияние негативное. Ну, и соответственно, в этой работе я не увидел, собственно такой характеристики этих структур и, в связи с этим, возникает вопрос, делалось ли что-то такое, если делалось, то получилось да, ну, собственно, и все. Ну, наверное, можно подводить итог. На мой взгляд, это законченное исследование, в котором получены интересные значимые результаты, результаты этого исследования опубликованы в соответствии с требованиями ВАК, при выполнении работы диссертантом продемонстрирована высокая квалификация и, таким образом, я думаю, что эта работа полностью соответствует требованию, которое предъявляется к кандидатским диссертациям, а ее автор Арсен Мизамудинович Куджаев, заслуживает присвоения степени кандидата химических наук по специальности биорганическая химия.

Иванов В.Т., председатель: спасибо Илья Валерьевич. Арсен Мизамудинович, вам слово для ответа на замечания.

Куджаев А.М., соискатель: уважаемый Илья Валерьевич, спасибо за внимательное отношение к моей работе и за замечания сделанные, с которыми я, в целом, согласен. Замечания по поводу корректного описания условий экспериментов я учту обязательно в дальнейшей работе над Lon-протеазой. Касаясь второго замечания, сложность интерпретации результатов модифицированных форм Lon-протеазы – это представляет собой довольно сложную проблему. Безусловно, делеции и мутации приводят к изменениям в структуре фермента и, я полагаю, косвенным подтверждением может служить пониженные степени олигомеризации модифицированных форм фермента и микрокалориметрические исследования, приведенные в диссертационной работе. Также для получения прямых экспериментальных данных мы пробовали кристаллизовать все модифицированные формы Lon-протеазы, но, к сожалению, пока что безуспешно. У меня все.

Иванов В.Т., председатель: все у вас? Спасибо. Переходим ко второму официальному отзыву. К сожалению, Татьяна Викторовна Демидкина не смогла присутствовать с учетом эпидемиологической ситуации и Владимир Александрович зачитает нам ее отзыв.

Олейников В.А., учёный секретарь: *(излагает положительный отзыв Демидкиной Т.В.).*

Да, у меня в руках отзыв официального оппонента на эту работу, которую мы сегодня рассматриваем. Ну и вот, что она пишет. Работа построена по традиционному плану, опять же 160 страниц, обзор литературы 56 страниц, и этот раздел обзора литературы написан хорошим, ясным языком, очень хорошо иллюстрирован 35 рисунками, содержит ссылки на 138 публикаций. Публикация обзора была бы полезной для многих исследователей. Большой объем выполненных экспериментов, подробный анализ полученных результатов представлен в двух разделах главы «Результаты работы и их обсуждение». И далее, подробно рассматривается первый раздел, далее второй раздел, ну в общем, мы сегодня в докладе слышали великолепное совершенно выступление предыдущего оппонента и, я думаю, что в принципе это можно уже и опустить, поскольку здесь достаточно подробно изложено вот то, что мы с вами уже знаем. Достаточно объемно написано. И завершает раздел главы «Результаты работы и их обсуждение», так, и вот очень подробно написано, да. Далее, примененные в главе «Результаты работы и их обсуждение» экспериментальные данные очень наглядно проиллюстрированы, опять же подробно обсуждены, выводы сделанные для каждого из разделов, логически следуют из полученных результатов. Результаты работы опубликованы в 8 рецензируемых российских и международных журналах и доложены на конференциях, проведенных в Российской Федерации и за рубежом. Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание и результаты работы, без сомнения, будут полезны целому ряду организаций, в которых предлагается их использовать и далее. Вот недостатки. Несмотря на многочисленные достоинства работы, число которых относится и хороший грамотный язык, которым она написана, ниже приводятся некоторые замечания, касающиеся ее оформления. Хотя в работе встречается минимум англицизмов, считаю неудачным использование термина «фолд» вместо «ход полипептидной цепи»; второе: наряду с использованием названия «мутантная форма» для точечных замен аминокислотных остатков в ферменте часто используется неправомерное для данного случая название «мутант»; третье: в таблице 5 главы «Результаты работы и их обсуждение» следовало указать, для какой длины волны приведен коэффициент молярной экстинкции; четвертое: в списке цитированной литературы данные для некоторых статей, опубликованных в российских журналах (например, ссылки 102, 111 и другие) приводятся для их английского варианта. А далее, как бы заключение, диссертация Куджаева по объему и уровню выполнения и актуальности полученных результатов полностью соответствует критериям, установленным положением присуждения ученых степеней, утвержденных постановлением правительства и т.д., а Арсен Мизамудинович Куджаев, несомненно, заслуживает степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 –

биоорганическая химия. Ну и подписано, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук, доктор химических наук, профессор Татьяна Викторовна Демидкина. Ну, то есть, было несколько замечаний.

Иванов В.Т., председатель: слово имеет диссертант.

Куджаев А.М., соискатель: я благодарю Татьяну Викторовну Демидкину за глубокое рассмотрение диссертационной работы и сделанные замечания. Я согласен со сделанными замечаниями, конечно, следует избегать по возможности англицизмов, которые активно внедряются в научный язык и следовало бы указать русскоязычные версии статей из российских журналов. А что касается третьего замечания, то коэффициенты экстинкции, рассчитанные с помощью программного обеспечения Exrasy, определены при длине волны 280 нм, и это следовало бы указать в таблице для полной картины. Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: далее, у нас все сделано для того, чтобы перейти к общей дискуссии. Обычно в общих дискуссиях мы говорим о том, как с точки зрения выступающего, надо голосовать. Какие есть сопутствующие к тому, что было уже сказано, соображения в ту или иную сторону. Есть ли желающие принять участие в общей дискуссии? Александр Габибович, прошу.

Габибов А.Г.: ну, здесь уже неоднократно отмечалось, что это крайне интересная тематика, очень интересный объект, я могу, конечно, проследить динамику развития, потому что лет 15 назад я оппонировал диссертации докторской Татьяны Ротановой. И, конечно, продвинуто достаточно много в плане этой работы. Стоит вопрос, стоит ли заниматься столь прицельно вот протеазами? Я заканчивал, как известно, кафедру химической энзимологии, которую называли в свое время химотрипсиновой кафедрой. Вот, и вообще конечно, протеазы неисчерпаемы как атом, но я хочу сказать, что, действительно, Lpp-протеазы очень интересны. По замечаниям Белогурова, действительно есть определенные элементы вот связи, так сказать, похожесть протеаз и протеасомы и, конечно же, есть и Hsp, есть целый ряд так сказать вот, наверное эволюционные какие-то карты может быть, я не очень этим занимаюсь, построены и очень интересна функциональная далекая гомология с биокатализаторами разных функций, ну, собственно, шапероны тоже, биокатализаторы АТФ-зависимые, как мы знаем, вот это все действительно крайне важный, наверное действительно не стоит бросать этот объект, но нужно заниматься этими объектами современно. Энзимология современная не может двигаться без трехмерной биологии. 3D, как здесь правильно отмечено, профессором Демидюком Ильей Валерьевичем, который

является очень приятным, известным специалистом в области протеаз, значит, протеолитических ферментов, приятно, что он участвует на нашем заседании. Вот, конечно, необходимо, так сказать, понимание 3D. И эта работа сильно выигрывает, потому что был привлечен один из крупнейших кристаллографов мира, не побоюсь этого слова, Алекс Влодавер, который большой друг России, так сказать очень много бывал здесь и известный специалист, он работает в НИИ, и вот он взялся за этот объект. И то, что Арсен смог эти данные обобщить и представить, это очень хорошо. Значит, вот я хочу положительно оценить и самого Арсена, я его давно знаю, естественно, в лаборатории имеет огромный опыт работы и, в общем, мне кажется, что это очень важный вклад в развитие вообще института и мы должны проголосовать, мне кажется, положительно за эту работу. Ну вот не для протокола, я скажу вот, мое как бы директорство заставляет меня быть все же еще и жестче, не знаю до какого предела я дойду, я крайне недоволен ответами Арсена в области 3D биологии. Значит, я считаю, что человек, диссертант, каждый докладчик, который докладывает результаты, все что спросил Владимир Александрович, все могло быть вами Арсен отвечено совершенно четко, это не должно никак сказаться на заседании, но все здесь люди очень понимающие. Я очень жалею, что не прослушал ваш доклад до защиты. Спасибо. Я прошу всех проголосовать положительно.

Иванов В.Т., председатель: мы вас услышали. Кто еще хотел бы поучаствовать в дискуссии?

Олейников В.А., учёный секретарь: между прочим, у нас в удаленном доступе тоже есть люди, не члены совета, они тоже могут выступить. Миша, там не заявок?

Иванов В.Т., председатель: даже после этой добавки, у меня такое ощущение, что мы можем завершать нашу дискуссию. Мнение уже сложилось. И я даю слово диссертанту для заключительного слова.

Куджаев А.М., соискатель: спасибо, хочу поблагодарить диссертационный совет за возможность представить диссертацию на совете, во-вторых я хотел бы выразить глубокую признательность официальным оппонентам Демидкиной Татьяне Викторовне и Илье Валерьевичу Демидюку за объективные отзывы, и общую положительную оценку моей работы. Далее хотел бы поблагодарить своего научного руководителя – доктора химических наук, профессора Татьяну Васильевну Ротанову за ценные советы на всех этапах выполнения работы. Позвольте также поблагодарить ведущую организацию – «Институт биомедицинской химии Ореховича» и Нину Ивановну Соловьеву за интерес, проявленный к моей работе. Также хотел бы поблагодарить зарубежных коллег из

лаборатории кристаллографии макромолекул Национального института рака – профессора Александра Влодавера и доктора Аллу Евгеньевну Гущину. Позвольте также поблагодарить Учебно-Научный Центр ИБХ, Татьяну Владимировну Овчинникову и Юлию Федоровну Леонову за помощь в N-концевом секвенировании стабильных фрагментов Lon-протеазы. Выражаю огромную благодарность Ивану Витальевичу Смирнову за активное участие в обсуждении результатов работы. Также хотел бы выразить искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории химии протеолитических ферментов и коллегам за плодотворное сотрудничество и обсуждение результатов. Отдельно хотел бы поблагодарить Анну Говардовну Андрианову, Елену Николаевну Калиберду и Оксану Викторовну Серову за помощь при постановке экспериментов. А также огромное спасибо моей семье за поддержку, которую оказывали во время работы над диссертацией. Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: спасибо, двигаемся дальше. Чтобы голосовать нам нужно избрать счетную комиссию. У меня уже традиционно подготовлено некое предложение, зачитываю фамилии без регалий, имен и отчеств, Дзантиев, Зубов и Олейников. Традиционный состав из трех человек, как правило, абсолютно достаточно для быстрого подсчета голосов. Есть какие-то дополнения, отводы, самоотводы? Давайте для формальности примем решение, проголосуем за данный состав счетной комиссии. Кто за? Кто против? Счетная комиссия выбрана, но перед тем как объявлять перерыв, мы традиционно, предварительно обсуждаем проект заключения нашего совета по данной диссертации, с тем, чтобы потом, после объявления итогов голосования, уже проголосовать за проект заключения. И, если там требуется редакция, мы договоримся о том, что редакция должна быть сделана и мы уже голосуем за отредактированный проект заключения. Есть ли замечания по поводу того проекта, который представлен членами ученого совета?

Иванов В.Т., председатель: да, давайте, прошу к микрофону.

Завриев С.К.: у меня совсем маленькое замечание, вот тут на странице шестой написано: оценка результатов исследования выявило, что достоверность экспериментальных данных не вызывает сомнений, поскольку измерения проводились с использованием сертифицированного оборудования. Как-то это звучит немножко, мне кажется, не совсем правильно. Мне кажется, можно поставить точку. Не вызывает сомнений, точка. Измерения проводились... а то, что такая связь можно на сертифицированном оборудовании делать эксперименты и получить, так сказать, совершенно такие не очень интересные или правильные результаты.

Иванов В.Т., председатель: логично, логично. Я надеюсь, авторы этого проекта не возражают перед такой редакцией, и мы будем голосовать за отредактированный понятным образом текст заключения.

Завриев С.К.: и кстати, во втором заключении следующей диссертации нечто в таком же стиле. Немножко другие слова, но я уже второй раз не буду говорить.

Иванов В.Т., председатель: давайте подождем.

Завриев С.К.: но я уже второй раз не буду говорить.

Иванов В.Т., председатель: ну а почему, вдруг что-то изменится к этому моменту?

Завриев С.К.: это какой-то такой шаблон, который надо исправить.

Иванов В.Т., председатель: есть еще какие-то замечания? Тогда мы готовы проголосовать по этому вопросу тоже.

Иванов В.Т., председатель: перед тем как голосовать, последний раз задаю вопрос насчёт проекта заключения. Сергей Кириакович уже сказал своё предложение, мы его учтём. Есть какие-то ещё замечания? Нет Николая Владимировича Бовина, он обычно активно участвует в выступлении, но сейчас не тот случай. Тогда у нас все предварительные шаги исполнены, объявляю короткий перерыв на голосование.

(Идёт тайное голосование)

Олейников В.А., учёный секретарь: так, счётная комиссия завершила свою работу. По диссертации Куджаева Арсена Мизамудиновича. Присутствовало на заседании 20 членов совета, роздано бюллетеней – 20, оказалось в урне – 20, за – 20, против нет и недействительных нет.

Иванов В.Т., председатель: прошу утвердить итоги голосования. Кто за? Есть ли против? Поздравим диссертанта с успешной защитой! Ну и заодно и себя с тем, что в таких непростых условиях мы провели такую существенную работу. Спасибо, до следующей встречи.

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Учёный секретарь
диссертационного совета



д.ф.-м.н. Олейников В.А.