

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело №_____.

Решение диссертационного совета от «1» марта 2018 г. № 5 о присуждении Кудряевой Анне Анатольевне, гражданство Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Молекулярный механизм узнавания полипептидных субстратов регуляторными субъединицами протеасомы» по специальности 03.01.04 Биохимия была принята к защите 28 декабря 2017 года (протокол №16) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, строение 2. Совет учрежден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ №2249-1602 от 16.11.2007 г. С учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. №74/нк и от 10.02.2014 г. №55/нк и с учетом переименования Совета от 30.09.2015 г. №1166/нк.

В июне 2012 года Кудряева Анна Анатольевна окончила Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по специальности «Биоорганическая химия» и в ноябре 2012 года поступила в очную аспирантуру Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и в 2016 году успешно её окончила. С 2014 года по настоящее время является сотрудником лаборатории биокатализа.

Диссертационную работу Кудряева Анна Анатольевна выполняла в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Белогуров Алексей Анатольевич, кандидат химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории биокатализа.

Официальные оппоненты:

Хомутов Алексей Радиевич, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений;

Цимоха Анна Сергеевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток. дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» Российской академии наук в своем положительном заключении, подписанном заведующим лаборатории межмолекулярных взаимодействий доктором биологических наук Ивановым Алексеем Сергеевичем, указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, обладающим научной новизной и практической значимостью и соответствует критериям, изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, в редакции от 21.04.2016 г. №335, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Кудряева Анна Анатольевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что

доктор химических наук Хомутов Алексей Радиевич является признанным специалистом в области изучения биогенеза полиаминов. Фермент, участвующий в биосинтезе полиаминов, является наиболее хорошо изученным убиквитин-независимым субстратом протеасомы;

кандидат биологических наук Цимоха Анна Сергеевна является известным специалистом в изучении протеасомных комплексов и их функционирования.

Выбор ведущей организации обоснован активно ведущимися исследованиями убиквитин-протеасомной системы, наличием высококвалифицированных специалистов в данной области, а также проводимых исследований межмолекулярных взаимодействий с помощью оптических биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса.

Соискатель имеет 15 опубликованных работ, включающих 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, и 10 тезисов международных и всероссийских конференций.

1. Belogurov A. Jr, Kudriaeva A., Kuzina E., Smirnov I., Bobik T., Ponomarenko N., Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover A., and Gabibov A. / Multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein escapes control by ubiquitination during proteasomal degradation. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2014. — Vol. 289, no. 25. — P. 17758–17766.

2. Е.С. Кузина, А.А. Кудряева, Д.В. Мальцева, А.А. Белогуров / Пептидилальдегид, специфически взаимодействующий с иммуносубъединицей протеасомы $\beta 1i$: эффекты *in vitro* и *in vivo*. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2016. — Т. 161, № 1. — С. 69-71.

3. Кудряева А.А., Хаустова Н.А., Мальцева Д.В., Кузина Е.С., Глаголева И.С., Сурина Е.А., Кнорре В.Д., Белогуров А.А., Тоневицкий А.Г., Габибов А.Г. / Экспрессионный профиль мРНК олигодендроцитов мышцы в условиях воспаления. // *Доклады Академии наук, серия Биохимия и биофизика*. — 2016. — Т. 469, № 1. — С. 264–268.

4. Кузина Е.С., Кудряева А.А., Глаголева И., Габибов А.Г. и Белогуров А.А. / Деиминирование основного белка миелина замедляет его протеасомо-опосредованный метаболизм. // *Доклады Академии наук, серия Биохимия и биофизика*. — 2016. — Т. 469, № 1. — С. 277–280.

5. Kudriaeva A., Galatenko V., Maltseva D., Khaustova N., Kuzina E., Tonevitsky A., Gabibov A., Belogurov A. Jr. / The Transcriptome of Type I Murine Astrocytes under Interferon-Gamma Exposure and Remyelination Stimulus // *Molecules*. — 2017. — Vol. 22, no. 5. — P. 808-809.

В публикациях отражены экспериментальные работы, проведенные в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора химических наук Хомутова Алексея Радиевича (положительный) не содержал замечаний;

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук Цимоха Анны Сергеевны (положительный) содержал следующие замечания:

Некоторые важные моменты в автореферате изложены не слишком ясно, эти моменты прояснились только после чтения диссертации. Так, например, в автореферате очень тезисно описан эксперимент, в котором оценивается влияние деиминирования MBP пептидиларгининдеиминазой на его гидролиз протеасомой.

Встречаются опечатки, также используется различная номенклатура в написании субъединиц протеасом, как например, в случае с активатором PA28. В одном месте этот регулятор обозначен как 11S, в другом как PA28. Используются англицизмы. Не соответствуют друг другу описание схемы эксперимента добавления к клеткам ингибиторов протеасомы и деубиквитиnaz и резорфуфина при определении времени полужизни убиквитина в тексте и пояснения в соответствующем рисунке.

Не совсем понятно, если деиминирование MBP под действием PAD препятствовало взаимодействию MBP с протеасомой и приводило к замедлению его гидролиза *in vitro*, почему тогда согласно данным в литературе у больных с хроническим рассеянным склерозом зафиксировано увеличение деиминирования MBP в зависимости от скорости развития заболевания.

В описании результата гидролиза MBP *in vitro* необходимо уточнить, как были получены различные очищенные комплексы 20S протеасомы с регуляторами PA28.

В силу того, что соавторы ранее показали, что иммунопротеасомы гидролизуют MBP эффективнее, чем конститутивные протеасомы, желательно дополнительно контролировать каспазо-подобную активность протеасом в реакции расщепления флуорогенных пептидов.

Однако все высказанные замечания не подвергают сомнению достоверность полученных результатов и не отражаются на их высокой научной значимости.

Отзыв ведущей организации Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (положительный) не содержит замечаний.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

руководителя группы химии гетероциклических соединений ФГБУН ИБХ РАН Баранова Михаила Сергеевича, замечаний нет;

кандидата химических наук Пахомова Алексея Александровича. В отзыве приведено следующее замечание: «Несмотря на старания автора подать материал наглядно, из-за имеющихся упущений фактического материала в тексте, оценить адекватность использованных подходов и корректность полученных данных местами было

затруднительно. К примеру, в первых экспериментах не объясняется, зачем использовался циклогексимид (CHX) и MG-132. В тексте не сказано, проводилась ли котрансфекция LplA(AAG), куда вводился сайт LAP2, лишь на основании рисунков можно предположить, как был построен эксперимент. О том, что конструкциями, кодирующими MBP и DHFR, трансфицировали клетки в разных экспериментах можно судить только по приведенным данным последующих опытов. Возможно, такая «тезисность» при подаче материала объясняется ограничениями в объеме автореферата, однако это делает саму работу в ряде мест более сложной для восприятия и в общем менее понятной.»

В дискуссии приняли участие:

д.б.н Юрина Надежда Петровна,

д.б.н. Капрельянц Арсений Сумбатович,

д.х.н. академик РАН Габибов Александр Габибович.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие основные результаты:

1. Проведена оптимизация методики внутриклеточного ферментативного мечения полипептидных субстратов резорубином (PRobe Incorporation Mediated by Enzymes – PRIME) для анализа их внутриклеточной деградации в физиологических условиях. Использование данной методики позволило впервые оценить важнейшие параметры функционирования убиквитин-протеасомной системы и молекулярные механизмы ассоциации полиубиквитиновых цепей с протеасомой, в том числе определить стабильность непосредственно убиквитина, полиубиквитиновых цепей разного типа ветвления, а также среднее количество мономерных единиц убиквитина на молекулу субстрата в состоянии динамического равновесия.

2. Показано, что молекулярный механизм убиквитин-независимого гидролиза основного белка миелина (MBP) протеасомой обусловлен его аномально высоким положительным зарядом, опосредующим ассоциацию MBP с регуляторными субчастицами протеасомы. Была теоретически предсказана и экспериментально подтверждена аминокислотная последовательность миелин-подобного дегрона, способного придавать полипептидам способность подвергаться гидролизу протеасомой без участия убиквитина.

3. Путем широкомасштабного транскриптомного профилирования был зафиксирован повышенный уровень экспрессии субъединицы протеасомы REG α в первичной культуре глии при воздействии воспалительного стимула. Показано, что данные

регуляторные комплексы в форме ассоциированного с протеасомой гептамера в значительной степени ускоряют протеолиз МВР.

4. Разработаны подходы к направленному замедлению внутриклеточного протеасом-опосредованного метаболизма МВР. Показано, что специфический ингибитор иммуносубъединицы $\beta 1i$ селективно воздействует на протеасому *in vivo*, с другой стороны деиминирование МВР под действием пептидиларгининдеиминазы препятствует взаимодействию МВР с протеасомой, что в свою очередь замедляет гидролиз МВР протеасомой как *in vitro*, так и в клетках млекопитающих.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

В настоящей работе впервые было корректно определено время полужизни убиквитина, а также среднее количество молекул убиквитина, конъюгированное с субстратами протеасомы. Проведена оценка субстратной специфичности протеасомы к полиубиквитиновым цепям различного типа ветвления, и показано, что в среднем от одной до двух молекул убиквитина утилизируется совместно с белком-мишенью. Кроме того, был подтвержден факт убиквитин-независимого протеолиза аутоантигенного белка, основного белка миелина, и установлен механизм данного процесса. Была теоретически предсказана и экспериментально подтверждена аминокислотная последовательность миелин-подобного дегрона, способного придавать полипептидам способность подвергаться гидролизу протеасомой без участия убиквитина.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Разработаны подходы к направленному замедлению внутриклеточного протеасом-опосредованного метаболизма МВР с помощью специфических ингибиторов иммунопротеасомы. Диссертационная работа вносит существенный вклад в прояснение механизмов работы такого сложного протеолитического комплекса как протеасома, что в дальнейшем может быть использовано для создания лекарственных препаратов, направленных на тканеспецифичное и избирательное подавление протеолитической активности протеасомы.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что

Используемые методики исследования корректны;

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, результаты получены на современном оборудовании и хорошо воспроизводимы;

Выводы диссертационной работы четко сформулированы, отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит в:

планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

Диссертация Кудряевой Анны Анатольевны является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого арсенала современных методов и взаимосвязанностью выводов и результатов.

На заседании «1» марта 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Кудряевой Анне Анатольевне ученую степень кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 13 докторов биологических наук, 5 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

«За» - 19 , «Против» - нет , недействительных бюллетеней - нет .

Заместитель председателя диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

доктор химических наук, профессор



Дзантиев Б.Б.

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

кандидат биологических наук



Орловский А.Ф.

«2» марта 2018 г.