

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН),
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 13 марта 2024 г. № 5

О присуждении **Агаповой Юлии Константиновне**, гражданки Российской Федерации
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация “НУ белок из *Spiroplasma melliferum*: структурная организация, специфичность ДНК-связывания и низкомолекулярные ингибиторы”, по специальности 1.5.3. Молекулярная биология принята к защите 6 декабря 2023 (протокол заседания №30) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (адрес: 117997, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, ГСП-7, Москва), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г., а также Приказа Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Агапова Юлия Константиновна, 4 марта 1993 года рождения. В 2017 году соискатель закончила магистратуру Московского физико-технического института по направлению “Прикладная физика и математика”. В 2021 году соискатель окончила аспирантуру Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (НИЦ «Курчатовский институт»), г. Москва.

Соискатель работает лаборантом-исследователем в Национальном исследовательском центре “Курчатовский институт”. Диссертация выполнена в лаборатории “Геномная фабрика” Центра геномных исследований “Курчатовский геномный центр” Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт».

Научный руководитель - кандидат химических наук, Ракитина Татьяна Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории белков гормональной регуляции Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Официальные оппоненты Иванов Александр Владимирович, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, и Горбачев Алексей Юрьевич, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории протеомного

анализа, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Москва, в своем **положительном** отзыве, подписанном Матюшкиной Дарьей Сергеевной, кандидатом биологических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории простых систем, и утвержденном директором академиком РАН Говоруном Вадимом Марковичем, указала, что диссертационное исследование Агаповой Юлии Константиновны является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор, Агапова Юлия Константиновна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 36 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 9 работ общим объемом 5 печатных листов, опубликованных в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Агапова Ю.К. внесла основной либо существенный вклад:

1. **Agapova Yu. K.**, Altukhov D., Timofeev V., Stroylov V., Mityanov V., Korzhenevskiy D., Vlaskina A., Smirnova E., Bocharov E., Rakitina T. (2020). Structure-based inhibitors targeting the alpha-helical domain of the *Spiroplasma melliferum* histone-like HU protein. Scientific Reports. 15, 15128.
2. Kamashev D.N., **Agapova Y.K.**, Rastorguev S.A., Talyzina A.A., Boyko K.M., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A., Vasilov R., Timofeev V.I., Rakitina T.V. (2017). Comparison of histone-like HU protein DNA-binding properties and HU/IHF protein sequence alignment. PLoS One., 12, e0188037.
3. Boyko K.M., Rakitina T.V., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A.V., **Agapova Y.K.**, Kamashev D.E., Kleymenov S.Y., Popov V.O. (2016). Structural basis of the high thermal stability of the histone-like HU protein from the *mollicute Spiroplasma melliferum* KC3. Sci. Rep., 6, 36366.

4. **Агапова Ю.К.**, Талызина А.А., Алтухов Д.А., Лаврентьев А.Л., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. (2019) Виртуальный скрининг, мишенью которого были сигналы димеризации двух микоплазменных HU-белков, выявил разные типы ингибиторов, взаимодействующих с общими детерминантами связывания, Кристаллография, 64, 577-582.
5. **Агапова Ю.К.**, Алтухов Д. А., Камашев Д. Э., Тимофеев В. И., Смирнова Е. В., Ракитина Т. В., (2020). Ингибитор, нацеленный на границу между мономерами белка HU из *Spiroplasma melliferum*, нарушает конформационную динамику и ДНК-связывающие свойства белка. Кристаллография. 2020, 65, 900-906.
6. **Агапова Ю.К.**, Петренко Д.Е., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. (2022). Сравнительный анализ границы между мономерами в димере бактериальных гистоноподобных белков HU методом ММ, Кристаллография, 67, 918–925.
7. Талызина А.А., **Агапова Ю.К.**, Подшивалов Д.Д., Тимофеев В.И., Сидоров-Бирюков Д.Д., Ракитина Т.В., (2017). Применение виртуального скрининга и молекулярной динамики для анализа селективности ингибиторов HU белков, направленных на ДНК-распознающий сайт. Кристаллография, 62, 917–922.
8. Камашев Д.Э., Ракитина Т.В., Матюшкина Д.С., Евсютина Д.В., Ванюшкина А. А., **Агапова Ю.К.**, Анисимова В.Е., Дробышев А.Л., Бутенко И.О., Побегуц О.В., Фисунов Г. Ю. (2019). Изменение протеомного профиля *e. coli* при удалении генов, кодирующих гистоноподобный белок HU: по данным дифференциального двумерного гель-электрофореза, Биоорганическая химия. 45, 524–533.
9. Комолов А.С., **Агапова Ю.К.**, Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. (2021). Влияние нарушения границы между мономерами в димере на структурно-динамические свойства HU-белка из *Spiroplasma melliferum*. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 10, 15623–27.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н., **Иванова Александра Владимировича**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Основной возникающий вопрос касается выбора метода для анализа взаимодействия между белками и ДНК-дуплексами. В данной работе автор выбрал достаточно трудоемкий метод анализа комплексов торможениями в полиакриламидном геле. В то же время более производительным методом мог быть дот-блот, заключающийся в фильтровании реакционных смесей последовательно через нитроцеллюлозную и нейлоновую мембраны. На первой будет задерживаться комплекс меченой ДНК и белка, а на второй – свободная

нуклеиновая кислота. Этот метод дает простые для обсчета данные. Каким преимуществом обладал метод анализа комплексов в геле?

2. Несмотря на большое количество экспериментов, диссертант не обсуждает стехиометрию взаимодействия и его кооперативность.

3. В Экспериментальной части имеется некоторое количество технических недочетов. Так, в таблице 6 говорится о том, что раствор уксусной кислоты имел рН 7,5, в таблице 7 не приведено соотношение акриламида и бисакриламида - важный параметр гелей. Не очень корректным является перевод английской аббревиатуры NERES на русский язык, а также использование англицизма «глицерол» вместо распространенного слова «глицерин». Наконец, в подразделе про выделение белков желательно было бы указать, ингибиторы каких именно протеинкиназ использовали в работе.

4. Описание наработки и выделения рекомбинантных белков правильнее было бы сопроводить таблицей с выходами каждого из них.

Отзыв официального оппонента к.б.н., **Горбачева Алексея Юрьевича**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. В формулировке задач и выводов имеются некоторые расхождения: первой задачей автор ставит «Биоинформатический анализ близкородственных гистоноподобных белков бактерий (HU и IHF). Отбор модельных HU белков для функциональных исследований». При этом в выводах прямо не говорится, что такой выбор осуществлен, хотя это и понятно по смыслу, но все же имеется формальная погрешность.

2. Имеются несколько пунктуационных ошибок - в некоторых местах пропущены необходимые знаки препинания.

3. Некоторые из представленных рисунков имеют подписи на английском и русском языке одновременно.

4. Имеются небольшие отклонения в оформлении списка публикаций от рекомендуемых стандартов.

5. Автор несколько раз использует выражение “MMR-mismatch repair”, хотя обычно в литературе используют либо “MMR”, либо “mismatch repair”, то есть получается двойной повтор одного и того же.

6. В актуальности работы автор говорит о том, что микоплазмы вызывают заболевания человека, но в качестве основного объекта фокусируется на HU-белке *Spiroplasma melliferum*. Данная бактерия относится к одному с микоплазмами классу - *Mollicutes*, но входит в совершенное другое семейство и является паразитом пчел. При этом в тексте работы автор указывает, что HU белок из *S. melliferum* был наиболее интересен тем, что имел наибольшее число отличий от белка из *E.coli*. Хотелось бы спросить у автора,

почему основные исследования были посвящены именно белку из спироплазмы, хотя более актуальным кажется исследование структуры HU-белка человеческих патогенов из рода микоплазм?

7. Автором в ходе работы была показана ингибирующая активность бисфенольных производных флуорена по отношению к способности белка HU связывать ДНК. Насколько значения полученных констант связывания позволяют рассматривать данные соединения в качестве потенциально терапевтических?

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Диссертантом в своей работе был сделан акцент на изучении HU- белков четырех разных микроорганизмов: двух представителей класса молликут, кишечной палочки и бактерии *Neisseria gonorrhoeae* (к сожалению, отсутствуют названия штаммов бактерий). Хотелось бы в тексте диссертации побольше получить информации о причине выбора именно этих объектов для изучения. Какова гомология HU-белков у данных бактерий? Кроме того, для выбранных микроорганизмов существенно отличается ареал обитания и условия культивирования. Так, для спироплазм в естественной среде отмечены два хозяина: насекомые и растения, и характерной температурой культивации для них является 28-30°C. В свою очередь, для *Mycoplasma gallisepticum* типичным хозяином является домашняя птица, нормальной температурой которой является 42°C. Хотелось бы, что бы в данной работе было больше уделено внимания температурным особенностям исследуемых объектов, поскольку при разной температуре может отличаться характер связывания HU-белка с ДНК. Существенным дополнением к работе был бы анализ температуры плавления комплекса HU-белка с ДНК. Было бы интересно сравнить изотермы стабильности комплекса из разных микроорганизмов при разных температурах.
2. Было бы интересно узнать мнение автора, почему для HUSpm наблюдается высокая термостабильность по сравнению с другими исследуемыми в работе белками. Зачем это необходимо с биологической точки зрения? Это особенно интересно в контексте того, что по сравнению с другими выбранными объектами, *Spiroplasma melliferum* живет при более низких температурах.
3. Для оценки связывания белка с ДНК использовался хоть и хорошо себя зарекомендовавший, но архаичный метод торможения в геле, в результате постановки которого могут появляться различные артефакты. Хотелось бы, чтобы ряд результатов был подтвержден ортогональным методом. Кроме того, рисунок 13 в тексте диссертации труден для восприятия (знаки минус сверху рисунка практически сливаются с границей лунок геля).

4. При расчете констант диссоциации были ли взяты во внимание данные об аномальном содержании АТ-оснований в молликутах?
5. При создании мутантных вариантов HU-белка проводился ли контроль сохранности правильной их вторичной и третичной структуры физическими (снятие КД-спектра) и/или расчетными методами?
6. Для оценки влияния ингибиторов на рост *M. gallisepticum* и *S. melliferum* в культуре применялся тест микроразведений в бульоне. Но данный метод в большей степени свидетельствует об уровне метаболизма клеток (за счет изменения цвета индикатора в среде при ее закислении), а не о количестве клеток. Для более уверенных выводов о влиянии БПФ на гибель бактерий лучше определять количество клеток высевом на полужидкую/твердую питательную среду.

Отзыв на автореферат к.б.н., **Юрковой Марии Сергеевны**, старшего научного сотрудника, лаборатории молекулярной биотехнологии, ФИЦ “Фундаментальные Основы Биотехнологии” РАН. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Отзыв на автореферат д.х.н., **Ротановой Татьяны Васильевны**, ведущего научного сотрудника, лаборатории химии протеолитических ферментов, ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии, геномной инженерии, протеомики, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих научных международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы, а также высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что в рамках исследований, проведенных соискателем, было показано, что каждый представитель семейства белков HU/INF (InterPro ID IPR000119) может быть однозначно отнесен к одной из трех групп: HU, INF_A или INF_B. Впервые были получены и функционально охарактеризованы новые HU белки из организмов *Neisseria gonorrhoeae*, *Spiroplasma melliferum*, *Mycoplasma gallisepticum*. Показано, что каждый из исследуемых HU белков имеет свой индивидуальный профиль аффинности к различным ДНК-структурам. Получена и охарактеризована пространственная структура HU белка из *Spiroplasma*

melliferum(HUSpm). Выявлены ключевые структурные детерминанты, ответственные за высокую термостабильность белка. Впервые найдено, что бисфенольные производные флуорена (БПФ) ингибируют ДНК-связывающую способность HU белков с IC_{50} в диапазоне 5-10 мкМ. Показано, что БПФ проявляют антимикробную активность в отношении микоплазм. Показано, что в ключевую роль в связывании БПФ и короткой дцДНК играют разные аминокислотные остатки, что позволяет предположить, что ингибирующее действие БПФ не связано с конкуренцией с ДНК за сайт связывания, а имеет аллостерическую природу.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что были расширены знания о семействе белков HU в целом и в частности о HU белках микоплазм. Была получена пространственная структура HUSpm, решенная с высоким разрешением, которая использовалась для изучения структурных детерминант, определяющих высокую термостабильность белка, а также для поиска низкомолекулярных ингибиторов методом молекулярного докинга. Было установлено, что в связывании БПФ и коротких модельных ДНК ключевую роль играют разные области HUSpm, что указывало на аллостерический механизм ингибирования, который ранее обсуждался в научной литературе, но не имел экспериментального подтверждения.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что были получены и охарактеризованы низкомолекулярные ингибиторы ДНК-связывающей способности HU белков, способные ингибировать рост микоплазмы в культуре, которые могут стать прототипами новых антибактериальных препаратов.

Достоверность полученных результатов определяется надёжностью применявшихся методов исследования, повторяемостью значений измеряемых параметров в многочисленных экспериментах. Все данные получены с использованием современного сертифицированного оборудования. Полученные в работе результаты подтверждаются современными исследованиями в данной области.

Личный вклад Агаповой Юлии Константиновны состоит в активном участии в планировании и постановке экспериментов, разработке методик, а также в обработке и анализе результатов. Соискателем были проведены эксперименты по клонированию генов, мутагенезу, а так же получению (выделение и очистка) четырех рекомбинантных HU белков и всех мутантных форм HUSpm. Соискатель провел сравнение ДНК-связывающих свойств полученных HU белков с использованием метода изменения электрофоретической подвижности ДНК в геле. Агаповой Ю.К. был проведен анализ пространственной структуры HUSpm и были выявлены аминокислотные остатки,

ответственные за высокую термостабильность HUSpm. Так же она провела проверку способности бисфенольных производных флуорена (БПФ) ингибировать ДНК-связывающие свойства HU белков из *S. melliferum*, *M. gallisepticum* и *E. Coli* и подавлять рост микоплазмы в культуре. Агапова Ю.К. проверила влияние аланиновых замен и уточнила механизм действия ингибиторов. Кристаллы, исследуемых белков были получены Николаевой А.Ю. (НИЦ Курчатовский институт). Сбор и обработка дифракционных проводилась Дороватовским П.В. (НИЦ Курчатовский институт) и Бойко К.М. (ИНБИ РАН). Стройлов В.С. и Зейфман А.А. помогли в поиске низкомолекулярных ингибиторов (ООО «МолТех»). Калориметрические эксперименты проводили совместно с Клейменовым С.Ю. (ИНБИ РАН) и Корженевскому Д.А. (НИЦ Курчатовский институт).

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет 24.1.037.01 заключает, что диссертационная работа Агаповой Юлии Константиновны является законченной научно-квалификационной работой, в которой решены научные задачи изучения природного разнообразия HU белков, сравнительного анализа ДНК связывающей способности HU белков микоплазменного и не микоплазменного происхождения, а также структурного анализа и поиска низкомолекулярных ингибиторов микоплазменного HU белка из *Spiroplasma melliferum*, что внесло существенный вклад в исследования белков данного класса. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты, а по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Таким образом, диссертационная работа Агаповой Юлии Константиновны «HU белок из *Spiroplasma melliferum*: структурная организация, специфичность ДНК-связывания и низкомолекулярные ингибиторы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Что в результате происходит с ДНК при взаимодействии с ней HU белка? Происходит ли изгиб ДНК в процессе связывания или нет?
2. Как проводился поиск низкомолекулярных ингибиторов? Есть ли уже какие-то известные ингибиторы? Насколько значение полученных констант позволяют использовать ваши соединения в качестве потенциально терапевтических?

3. Когда вы смотрели особенности ДНК связывания, смотрели ли вы зависимость от АТ/GC состава в олигонуклеотидах? Какого размера были олигонуклеотиды?
4. Что будет происходить с микроорганизмом, если убрать HU белок?
5. В своей работе вы представили нам структуру HUSpm. Однако у вас было несколько белков. Можете ли вы что-то рассказать о структуре HU белка из *M. Gallisepticum*? Проводились ли какие-то исследования связанные с ним?

Соискатель Агапова Ю.К. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы:

1. Существует две модели связывания HU белка с ДНК: с изгибанием ДНК (структурно-специфическое связывание) и ее выпрямлением (неспецифическое связывание). В зависимости от проходящих в клетке процессов задействуется один из них. Структурно-специфическое связывание более ограничено и происходит в определённых участках хромосомы, вовлечённых в такие процессы как, например, репликация или репарация. Неспецифическое связывание распространено гораздо шире и служит для базовой укладки геномной ДНК в нуклеоид, за счет своей возможности быстро реорганизовать ДНК.
2. Поиск проходил в коллаборации с коллегами ООО «МолТех». Был проведен скрининг химической библиотеки Vitas-M laboratories. Для молекулярного докинга была использована полученная нами структура HUSpm, а в качестве конкретного сайта связывания использовалась стабильная центральная область ДНК-связывающего домена. Ранее для *Mycobacterium tuberculosis* были получены трансстильбеновые ингибиторы. IC₅₀ и МИК в нашем случае имеют тот же порядок, который можно встретить в литературных источниках. Тем не менее, мы не планируем прямое использование этих соединений. Для дальнейшей работы с ними необходимо провести дополнительную оптимизацию.
3. Мы не ставили перед собой подобную задачу. В наших экспериментах константы диссоциации рассчитывались для конкретных комплексов с конкретными олигонуклеотидами. Для них GC состав подбирался в районе 50%. Размер олигонуклеотидов колебался от 21 до 48 п.о.
4. Известно, что при убиении HU белка, микоплазма умирает. Это происходит из-за отсутствия других НАБ, которые могли бы заменить его функции. Подобного не произойдет, например, в случае *E. Coli*, в которой присутствуют другие гистоноподобные белки, которые могут компенсировать отсутствие HU белка.
5. В рамках наших исследований мы взяли HU из *M. gallisepticum* не просто так. Мы знали, что у него уменьшено число остатков фенилаланина до 2-х, а так же присутствует N-концевое удлинение, состоящее из 6 остатков. К сожалению, не смотря на то, что мы получили кристаллы белка, дифракционные данные расшифровать не удалось. Поэтому, при структурных исследованиях, наше внимание было сосредоточено на HUSpm.

На заседании 13 марта 2024 г. диссертационный совет постановил за решение задачи изучения природного разнообразия HU белков, сравнительного анализа ДНК связывающей способности HU белков микоплазменного и не микоплазменного происхождения, а также структурного анализа и поиска низкомолекулярных ингибиторов микоплазменного HU белка из *Spiroplasma melliferum* присудить Агаповой Юлии Константиновне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 5 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3. – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

13 марта 2024 г.

