



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

СТЕНОГРАММА

**заседания диссертационного совета Д 002.019.01
при ИБХ РАН**

25 июня 2014 года

Защита диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук **Опарина Петра Борисовича** на тему:

« α -Гарпинины – защитные пептиды растений»

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Москва – 2014

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 25 июня 2014 года.

Председатель диссертационного совета
Академик РАН

В.Т. Иванов

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 22 человека, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1. Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6. Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
7. Член-корр. РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
8. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
9. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
10. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
12. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
13. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
14. Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
15. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
16. Д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
17. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
18. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
19. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
20. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
21. Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
22. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Приступаем к принятой нами повестке дня. Итак, первой защита Петром Борисовичем Опариным. Владимир Александрович, что у нас в личном деле?

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что материалы личного дела и документы предварительной экспертизы соответствуют требованиям Положения ВАК).

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Есть какие-то вопросы, замечания по тому, что мы только что слышали? Все традиционно, естественно, вопросов нет. Тогда – слово диссертанту. Петр Борисович, прошу, двадцать минут.

Опарин П.Б.:

(Излагает основные положения диссертационной работы.)

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

У кого есть вопросы? Васьковский.

Васьковский Б.В.:

Вы в докладе упомянули, что первичную структуру пептида вы определяли совместно с сотрудниками НИИ физико-химической биологии, а также позднее вы проводили N-концевое секвенирование пептидов. Можете чуть поподробнее рассказать о методических подходах, которые вы применяли для определения первичной структуры?

Опарин П.Б.:

Да, спасибо за вопрос. Для определения первичной структуры ингибитора BWI-2с сначала методом автоматического N-концевого секвенирования по Эдману была установлена последовательность из 20 аминокислотных остатков. Было показано, что в шестнадцатом положении находится остаток метионина, в связи с чем, было сделано предложение – расщепить полипептидную цепь бромцианом. В результате гидролиза было получено три фрагмента, которые далее были очищены также подвержены N-концевому секвенированию, также на автоматическом секвенаторе. И в результате сопоставления полученных последовательностей фрагментов и уже имеющейся N-концевой последовательности было установлено, каким образом эти фрагменты расположены в составе целого пептида. Таким образом, в общем-то, и была установлена первичная структура.

Васьковский Б.В.:

Какие работы проводились в НИИ физико-химической биологии?

Опарин П.Б.:

В НИИ физико-химической биологии имени Белозерского было проведено выделение фракции ингибиторов трипсина. Для этого последовательно осуществлялось выделение фракции ингибиторов на трипсин-сефарозе и последующая их очистка на ионообменной смоле. Далее с фракцией катионных ингибиторов работали уже мы и методом высоко-эффективной жидкостной хроматографии выделили компонент в чистом виде.

Васьковский Б.В.:

Еще можно один? То есть масс-спектрометрию вы в своей работе не использовали совсем?

Опарин П.Б.:

Использовали. Во-первых для установления массы различных пептидов, в частности для BWI-2с, как я и говорил, была рассчитана его молекулярная масса, она составила 5182 Да. Далее на разных этапах мы также использовали масс-спектрометрию для, в частности, подтверждения идентичности полученных рекомбинантных пептидов природным, для установления правильности замыкания дисульфидных связей, также для определения первичной структуры BWI-2с, полученные после гидролиза бромцианом фрагменты также определялись масс-спектрометрически. Ну и, я думаю, что на каких-то еще этапах мы тоже использовали масс-спектрометрию.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Долгих.

Д. б. н. Долгих Д.А.:

Скажите, пожалуйста, вот в системе экспрессии вы расщепляли энтеропептидазой и в некоторых случаях у вас это плохо работало. Вы не пробовали просто заменить сайт D4K на сайт D4L? Потому что в наших работах было показано, что он во многих случаях работает лучше, именно в случаях неспецифического щепления.

Опарин П.Б.:

Нет, мы подобных экспериментов не делали, однако в ряде работ мы заменяли сайт 4DK на 4DR, поскольку это также приводило к увеличению эффективности щепления гибридного белка, но в данном случае мы использовали остаток метионина для замены этого сайта в случае с неспецифическим гидролизом и, в общем-то, были вполне удовлетворены результатом, к тому же, щепление бромцианом протекает несколько проще, чем щепление энтеропептидазой.

Д. б. н. Долгих Д.А.:

А энтеропептидаза у вас из какого источника?

Опарин П.Б.:

Это человеческая энтеропептидаза, легкая цепь.

Д. б. н. Долгих Д.А.:

Коммерческий?

Опарин П.Б.:

Производства Института биоорганической химии.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Еще вопросы? Александр Габирович.

Д. х. н., профессор, чл.-корр. РАН Габибов А.Г.:

Спасибо за интересный доклад. Ну вот, так сказать венцом вашей работы, я так понимаю, является создание, так сказать, пептида Tk-hefu, который, собственно,

наверное, оптимальный такой вот ингибитор калиевых каналов. А вот, сделанные вами, так сказать, набранная масса материала не позволяет создать какой-то оптимальный алгоритм, на основе сделанных блоков пептидных, алгоритм создания заведомо оптимальных лекарственных средств на этом подходе? Вы думаете об этом?

Опарин П.Б.:

Ну, об этом еще достаточно рано говорить, мы скорее пока занимаемся фундаментальной частью этих исследований.

Д. х. н., профессор, чл.-корр. РАН Габибов А.Г.:

Ну, это весьма фундаментальная вещь. У вас есть мишень и у вас есть то, что на нее действует, поэтому это такая фундаментальная задача. Есть метод промера. Все в ваших руках.

Опарин П.Б.:

Ну, на данном этапе работы мы скорее нацелены на оптимизацию подхода для того, чтобы с большей эффективностью можно было проводить дизайн и получать активные пептиды с изначально заданной функцией, однако о создании лекарственных средств речи пока не идет. Тем не менее, в этом есть определенный смысл, поскольку антимикробные пептиды в целом сейчас рассматриваются как достаточно перспективные антимикробные агенты, и возможно, в дальнейшем на их базе будут разрабатываться какие-то препараты, но мы пока что еще далеки от этого.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

У меня вопрос по поводу укороченных аналогов гарпининов. Вы получили серии этих производных разной степени укороченности, у всех у них вроде бы был правильный фолд, правильный фолдинг, был активный центр на месте, но активности не было. Так, не совсем понятно, почему активности нет, может какие-то идеи есть? В чем же дело то?

Опарин П.Б.:

Ну, скорее всего это связано с утратой характерной для них конформации, непонятно каким образом конкретно происходит изменение структуры, но для ряда пептидов методом спектроскопии кругового дихроизма было показано, что вместо преобладания α -спиральных участков появляется преобладание неструктурированных.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

А мне казалось, у вас были картинки, которые показывали те же самые структуры.

Опарин П.Б.:

Нет, на картинках, я извиняюсь, что не прокомментировал это, это схематическое изображение, то есть это картинки, просто сделанные на основании 3D структур полноразмерных пептидов.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

А что, ЯМР не делался укороченных пептидов?

Опарин П.Б.:

Нет, к сожалению, не было у нас такой возможности.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Понятно. Ефремов.

Д. б. н., академик РАН, Лукьянов С.А.:

Если смотреть на ваш ингибитор калиевого канала, по сравнению с другими ингибиторами, он, там, эффективней, или наоборот, не дотягивает? Такой искусственно-сконструированный.

Опарин П.Б.:

Да, спасибо за вопрос. Да, на самом деле, как полученный Tk-hefu, так и исходный к-хефутоксин не являются достаточно эффективными блокаторами калиевых каналов, поскольку, как было показано, они действуют в микромолярных концентрациях, что для токсинов достаточно низкий уровень. Для блокаторов калиевых каналов считается хорошей концентрация порядка наномолей. Но, нами также проводились исследования, результатов которых я не докладывал, в частности нами также было получено еще одно производное, для которого было уже значительное увеличение активности в отношении калиевых каналов, и там уже показатель константы полумаксимального ингибирования значительно ближе к средней блокаторов калиевых каналов, ну, для эффективных блокаторов калиевых каналов.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Ефремов.

Д. ф.-м. н., профессор Ефремов Р.Г.:

Мой вопрос связан с вопросом Вадима Тихоновича, но несколько с другой стороны. Вот когда вы рассказывали о гибридной конструкции, химерной конструкции, вы в последовательность антимикробного пептида полноразмерного внесли участок, петлевой участок, соответствующий ингибитору трипсина и не обнаружили ингибиторной активности, при этом полноразмерный белок, два дисульфида, то есть, скорее всего, фолд сохранился. Вы сказали, что идей нет, почему это может не работать, а динамическое поведение вы не хотели рассмотреть? Потому что динамика может сильно измениться, и вообще, что известно о динамике вот таких вот гарпининов, прошитых двумя дисульфидными связями, кто-нибудь этим вопросом занимался?

Опарин П.Б.:

Спасибо за вопрос. Для ингибиторов и антимикробных пептидов, как отмечалось выше, характерна различная конформация спиральных участков, если в случае с

ингибиторами, такими как BWI и VhTI, спиральные участки располагаются параллельно друг другу, то в случае с антимикробными пептидами, они повернуты друг по отношению к другу под углом порядка сорока пяти градусов. Из-за этого возможно, что в случае с мутантными ингибиторами Tk-Mut 1, 2 и 3 петлевой участок, расположенный между α -спиралями не приобретает необходимой конформации или получает какие-то дополнительные искажения, которые негативным образом таким сказываются на общей активности пептида. Структурных данных по полученным производным у нас достаточно мало, как я говорил, были рассчитаны спектры кругового дихроизма для них, и для одного из пептидов Tk-Mut, где в состав Tk-AMP была пересажена петля, было показано сильное снижение α -спиральных элементов в составе молекулы и приобретение по большей части неупорядоченной структуры. для других пептидов этого показано не было, что, в общем-то, скорее тоже ставит больше вопросов, чем дает ответов, но динамические исследования мы, в общем-то, планируем провести, и в том числе мы планируем получить пространственные структуры для активного производного Ec-AMP мутантного и для одного из неактивных производных Tk. И если мы получим эти данные, то на их основании мы, наверное, уже сможем дать конкретный ответ на вопрос «почему так происходит?».

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Я хочу к укороченным аналогам вернуться. Скажите, а вы уверены, что правильно замкнуты дисульфидные связи? Там возможны разные варианты замыкания связей.

Опарин П.Б.:

Да, мы уверены, поскольку мы проводили соответствующую проверку. Ну, в случае с максимально укороченными пептидами, там нет вариантов, поскольку сохраняется только два остатка цистеина, а в случае с более длинными производными, где сохранялись все остатки цистеина, правильность замыкания подтверждалась сочетанием методов селективного гидролиза цепи, для этого пептид расщеплялся между всеми остатками цистеина последовательно, продукты гидролиза разделялись хроматографическим методом, и далее по сопоставлению масс полученных фрагментов с теоретически рассчитанными делался вывод о правильности или неправильности замыкания дисульфидных связей. Ну, и нами было показано, что фрагменты имеют нужные масс, из чего был сделан вывод о правильности замыкания дисульфидов.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо, есть еще вопросы? Вопросы иссякли. Спасибо. Отдыхайте. Ненадолго, но есть такая возможность. Переходим к заслушиванию отзывов. Отзыв ведущей организации.

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

Ведущая организация – это Московский Государственный Университет имени Ломоносова, отзыв полностью положительный, я зачитываю.

(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Петр Борисович, там были замечания. Есть желание ответить? Прошу.

Опарин П.Б.:

Так, первое замечание касалось необходимости расчета константы ингибирования для производных Ес-АМР-М и ВW1-Х1. Да, действительно следовало бы рассчитать константы ингибирования для них, это было бы значительно более лучшим показателем, чем расчет просто соотношения молярного для взаимодействия ингибитора и фермента, но поскольку указанные пептиды значительно более слабые ингибиторы в сравнении с исходным ВW1-2с расчет констант ингибирования для них был затруднен ввиду необходимости проведения более сложного эксперимента. В будущем, по крайней мере для Ес-АМР-М, планируется проведение подобных расчетов.

Второй вопрос касался списка сокращений, второе замечание касалось списка сокращений, здесь я полностью согласен, да, следовало бы ввести список сокращений отдельным разделом.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Далее у нас по процедуре есть возможность научному руководителю охарактеризовать диссертанта. Александр Александрович собирается это сделать.

К. х. н. Василевский А.А.:

Дорогие коллеги, Петр Борисович пришел к нам в лабораторию в 2007 году для выполнения курсовой работы, потом он защищал диплом, а сегодня он представляет вашему вниманию диссертационную работу свою. Семь лет, сразу так всего и не расскажешь, но я постараюсь что-то вам рассказать. И остановлюсь на двух основных, на мой взгляд, моментах. Петр Борисович, как вы наверное заметили, очень спокойный человек и очень скромный. И его спокойствие очень здорово контрастирует истеричностью его руководителя, даже сейчас я волнуюсь гораздо больше, чем волновался он, когда делал этот доклад или отвечал на ваши вопросы. И за нами иногда со стороны довольно забавно, я полагаю, наблюдать. Его скромность имеет отношение ко второму моменту, который я бы хотел отметить. Это то, что часто пропускается даже людьми, которые его окружают, и вот здесь вот, послушайте, Петр Борисович не завалили ни одного проекта нам с Евгением Васильевичем. Это – то редкое событие, когда на человека можно практически со стопроцентной гарантией положиться. Если он берет на себя что-то, то это будет сделано. Я характеризую его как сложившегося специалиста в области структуры и функции белков и пептидов и, более того, как готового к самостоятельной и даже амбициозной, я бы сказал, работы. Вот так вот я характеризую диссертанта. Если вы позволите, я бы хотел еще сказать пару слов. Это может быть стоило сделать позже, когда предлагается выступить всем желающим, но чтобы второй раз на сцену не выходить. Сегодня как никогда уместно вспомнить профессора Егорова. Под его руководством начиналось

исследование α -гарпининов и успешно развивалось, и сегодня очередной этап этой работы. Мы с оптимизмом смотрим в будущее, спасибо большое за те вопросы, которые вы задавали, именно на них мы дальше будем отвечать вместе с Петром Борисовичем. И Цезий Алексеевич с этого экрана, в свойственной ему веселой манере, шлет нам привет. Спасибо.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Есть еще у нас отзывы на автореферат?

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

Да. Значит, в совет поступило два отзыва на автореферат, оба отзыва положительные. В каждом есть какие-то маленькие, но замечания. Значит вот, первый отзыв. К недостаткам работы следует отнести подчас недостаточную подробность изложения отдельных полученных автором результатов, но дальше идет: в целом следует отметить высокий экспериментальный уровень, результаты, выводы, высокое научное значение, качественность научных знаний об особенностях нового семейства защитных пептидов растений, то есть работа соответствует, а Петр Борисович заслуживает. Подписано: главный научный сотрудник Института биохимии имени Баха, доктор биологических наук, профессор Валуева.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

А кроме «кратко» ничего не сказано, ни примеров, ни обоснования?

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

Да, недостаточная подробность изложения. И второй отзыв. Вот здесь – к недостаткам следует отнести сбивающие с толку названия для одного из пептидов дикого типа Tk-AMP-X2 на ряду с названиями BWI-X1, BWI-X2, Sm-AMP-X1 и Sm-AMP-X2, где приставки X1 и X2 призваны обозначить укороченные по внешним и внутренним цистеинам варианты. Тем не менее, основные результаты замечательные, работа полностью соответствует, а сам диссертант, несомненно, заслуживает. Подписан: Нольде С.Б., младший научный сотрудник лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии нашего института. Два замечания в автореферате.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Ну, Петр Борисович, если есть желание – можно выйти, если нет можно просто, мы учтем.

Опарин П.Б.:

Ну, я соглашусь.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Согласен, хорошо, разумно. Дальше мы должны заслушать официальных оппонентов. Я не знаю, в каком порядке, здесь у нас доктор биологических наук и

доктор химических наук. Кто у нас там по логике должен быть первый, я даже не берусь судить. Ну, давайте, как вот напечатано, так и будем двигаться. Доктор биологических наук, Коноврев Александр Васильевич. Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений.

Д. б. н., Коноврев А.В.:

Уважаемые коллеги, прежде всего я бы хотел поблагодарить диссертационный совет за приглашение выступить в качестве оппонента в Институте биоорганической химии, с учеными которого моих коллег и, в какой-то мере, меня в разные периоды времени связывали научные контакты.

(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

Можно отметить несколько чрезмерную категоричность в формулировке пункта 5 научной новизны, так как о сходстве антимикробных пептидов растений с токсинами беспозвоночных упоминали и другие авторы. В связи с этим, в качестве еще одного примера идеи в обсуждаемой области, витавшей в воздухе, разрешите показать иллюстрацию. Из презентации директора нашего института защиты растений, академика Павлюшина, с которой он выступил перед академиками, член-корреспондентами, а также директорами соответствующих институтов на очередной сессии защиты растений Российской академии сельскохозяйственных наук в ноябре 2009 года. Здесь сравниваются модели известных на тот момент 3D структур ингибитора трипсина из семян вероники, здесь слева вверху, некоторых защитных пептидов из растений, а также животных. Здесь хорошо видно, в частности наличие двуспиральной структуры ингибитора из вероники и одного из токсинов из скорпионов, внизу слева. Остальные выводы и положения полностью обоснованы и не вызывают возражений.

(Заканчивает зачитывать отзыв).

Спасибо за внимание.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо, Александр Васильевич. Диссертант должен ответить на замечания.

Опарин П.Б.:

Вначале хотелось бы поблагодарить Александра Васильевича. Большое спасибо ему за то, что согласился оппонировать мою диссертационную работу и проявил столько внимания, терпения в работе над ней. Далее по пунктам. Включение статей о 4-цистеиновых пептидах, то есть о α -гарпининовых пептидах, в состав обзора литературы возможно было бы более уместно, чем упоминание о них уже в обсуждении результатов. Однако, в построении текста диссертации имелась несколько другая логика, которой и было обусловлено включение статей о уже известных представителях данной группы в раздел результаты и обсуждения. Вторым пунктом – недостаточное количество ссылок на отдельные антимикробные пептиды, в частности на SFTI-1, да, на ингибиторные пептиды, в обзоре литературы. Здесь я полностью согласен, в принципе можно было бы показать большее количество литературных источников в отдельных случаях,

однако получилось так, что в моей работе достаточно большое количество ссылок и так, и поэтому дополнительное расширение обзора литературы местами было непозволительно. Далее, недостаточное количество ссылок на русскоязычные статьи. Что ж, здесь я, пожалуй, соглашусь, но с другой стороны, если сравнивать в процентном соотношении количество русскоязычных и англоязычных статей по данной теме, то перевес будет явно на стороне последних, чем и обусловлена подобная организация обзора литературы. Вопрос касательно обоснованности названия для семейства, как для новой группы. Опять же соглашусь, конечно, были известны и отдельные представители данной группы, и частичные структурные данные по этим представителям также были достаточно давно известны. На их основании уже выдвигалось предположение о том, что пептиды, характеризующиеся наличием четырех цистеинов, входящих в состав двух характерных цистеиновых мотивов, скорее всего, являются независимой группой защитных пептидов растений. Вернее, высказывалось предположение об их отнесении к независимому семейству антимикробных пептидов, другими авторами выдвигалось предположение о существовании независимой группы ингибиторов протеолитических ферментов, некоторые также высказывали предположение о существовании группы защитных пептидов растений. И мы в своей работе во многом отталкивались как раз таки от известных литературных данных, а также неопубликованных результатов сотрудников нашей лаборатории. В своей работе мы как раз таки попытались получить убедительные доказательства в пользу высказанного предположения о существовании этого независимого семейства. Нового, с точки зрения существующей системы иерархии защитных пептидов растений, поскольку ходившие до этого обозначения пептидов данной группы, как нам кажется, не являются достаточно корректными. И, поскольку об этом был как раз таки еще один вопрос, то есть комментарий, не было бы уместно приводить уже предлагавшиеся названия, вроде «4-цистеиновые пептиды» или «VhTI-подобные пептиды» или «MBP-подобные пептиды»? В данном случае, как нам кажется, ни одно из этих названий не отражало бы в полной мере всех характеристик исследуемой группы. Если позволите, я покажу дополнительный слайд. В частности, если говорить о ходившем ранее в пределах нашей лаборатории названия «4-цистеиновые пептиды», которое также было упомянуто в ряде публикаций, сделанных нашими сотрудниками, оно не совсем корректно, потому что, как было отмечено Александром Васильевичем, также существует ряд антимикробных пептидов беспозвоночных, на слайде вы можете видеть, это гомезин и тахиплезин, которые, по сути, являются 4-цистеиновыми антимикробными пептидами, но при этом явно не имеют отношения к исследуемой группе, поскольку они имеют совершенно иную пространственную организацию и являются антимикробными пептидами беспозвоночных. Название семейства как «MBP-подобных» или «VhTI-подобных» было бы уместно с точки зрения того, что MBP-1 является первым описанным представителем данной группы, VhTI первого была установлена пространственная структура, что уже давало основание для заключения о существовании независимого семейства. Однако, поскольку для MBP не было известно пространственной структуры, такое название как «MBP-1-подобные пептиды» было бы некорректным, в целом, это не

доказано. VhTI-подобные пептиды» было бы приемлемым вариантом, однако, как нам кажется, поскольку нами были получены ряд структурных данных, которые существенно расширили существующее представление о группе в целом, мы считаем, что данное нами название вполне обосновано. К тому же, как упоминалось, существует ряд структурных различий между группой антимикробных пептидов и группой ингибиторов протеаз в составе данного семейства, и поэтому называть их по представителю одной из подгрупп было не совсем корректно. Комментарий по поводу того, что сходство 4-цистеиновых токсинов и α -гарпининовых пептидов было отмечено раньше. Что ж, здесь я также согласен, в статье, в которой принимали участие и сотрудники нашей лаборатории, уже упоминалось сходство отдельных α -гарпининов такими пептидами как к-хефутоксин и другими из ядов близкородственных скорпионов и некоторых моллюсков рода *Conus*. Однако нами были получены экспериментальные подтверждения данных предположений, и более того, было показано, что данное структурное сходство позволяет с легкостью воспроизводить токсичность в пределах различных α -гарпининовых молекул. Соглашусь, впрочем, что в ряде случаев отдельные формулировки излишне категоричны, и можно было бы сгладить общее впечатление путем их модификации. Еще раз спасибо за оппонирование. Я надеюсь, я ответил на все вопросы. Спасибо.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Если оппонент не согласен с вашими ответами, то у него будет возможность поучаствовать в общей дискуссии. Двигаемся дальше. Опять Александр Васильевич. Александр Васильевич Ефимов, Институт белка РАН.

Д. х. н. Ефимов А.В.:

Уважаемые члены диссертационного совета, уважаемые коллеги, разрешите представить отзыв на диссертацию Петра Борисовича Опарина. Я постараюсь быть покороче, ем мой коллега. Тем не менее, как вы понимаете, в обязанности оппонента входит все-таки осветить в обязательном порядке некоторые положения, что я постараюсь сделать.

(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

У меня нет принципиальных замечаний по научному содержанию работы. Однако, хотелось бы выступить уже может быть не в качестве оппонента, который должен критиковать работу, а может быть в качестве, для дальнейшего развития хочу высказать некоторые пожелания автору в качестве развития дальнейшей классификации этого нового класса, который получил название α -гарпининов. Для того чтобы было понятно, о чем я хочу сказать, я сделаю некоторое отступление и напомню, что в белках глобулярных встречаются разные типы двуспиральных структур. Самый распространенный и известный – это α -спиральная шпилька. Как правило α -спиральные шпильки образуются длинными спиральями, соседними по цепи, более 3,5-4 витков. Самыми яркими представителями этого класса являются известные лейциновые zipper, ну, может быть кто знает, введенный термин Криком еще, есть такие структуры, которые называются Coiled Coil. Это двуспиральная структура из длинных α -спиралей, они действительно образуют α -

спиральные шпильки с параллельным либо антипараллельным расположением α -спиралей. Теперь, если мы посмотрим на структуры вообще глобулярных белков, то увидим, что α -спиралы упаковываются дискретно, согласно принципу плотной упаковки и, грубо говоря, их можно разбить на 2 больших класса типов упаковки: на ортогональный и параллельный-антипараллельный. То есть шпильки принадлежат как раз таки к антипараллельному расположению спиралей. А есть еще ортогональная упаковка, и там выделяют такие структурные мотивы, как например кальций-связывающие пары в кальций-связывающих белках, потом helix-turn-helix мотивы в ДНК-связывающих белках, а если мы посмотрим на все белки, то в общем получается перпендикулярно упакованные пары спиралей очень часто встречаются в белках в одной из хиральных форм и получила общее название α -уголки. Вот, если мы теперь посмотрим на результаты Петра Борисовича, то я абсолютно согласен с тем, что определенные структуры, состоящие из длинных α -спиралей, действительно являются α -шпильками, и они соответствуют названию класса « α -гарпинины», но, если вы посмотрите на другие структуры, которые состоят либо из коротких спиралей, либо одна спираль длинная, одна короткая, то упаковка там не антипараллельные спиралы, а ближе к ортогональной упаковке, и это другой класс, я бы его выделил тоже в другой класс, который тоже можно было бы назвать подклассом, термин не хочу предлагать, но совершенно ясно, что нельзя в одну кучу шпильки и вот эти α -уголки, которые имеют более близкую к ортогональной упаковке α -спиралей. Вот такое, с одной стороны замечание, с другой стороны предложение, у меня есть по научному содержанию. Ну, а в целом, работа заслуживает высокой оценки и, принимая во внимание все, сказанное выше, я считаю, что Петр Борисович заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук, а сама диссертация соответствует требованиям, предъявляемым пунктом 9 положения о порядке присуждения ученых степеней, разработанных ВАКом. Спасибо за внимание.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Слово диссертанту. Петр Борисович, их было немного, но были замечания.

Опарин П.Б.:

Большое спасибо, Александр Васильевич, за согласие отоппонировать мою диссертацию, за такой подробный анализ работы. Что касается α -шпилек и α -уголков, то я совершенно согласен, что α -спиралы с параллельной и непараллельной укладкой являются по сути разными структурами, что в том числе было показано и в ходе моей работы. Так, было установлено, что различная конформация α -спиралей коррелировала с различной биологической активностью, различной функциональной нагрузкой этих пептидов. Однако, представители α -гарпининов были объединены в семейство по целому ряду общих признаков, как структурных, так и функциональных, и структурные сходства у них были выявлены как на уровне первичной структуры, так и вторичной и отчасти на уровне супервторичной структуры, что и послужило поводом для отнесения их к единому

семейству. Однако, опять же соглашусь, вполне возможно, что в дальнейшем будут выделены какие-то подгруппы в данном семействе, поскольку, очевидно, что, несмотря на общую защитную функцию, биологическая активность этих двух подгрупп в корне различна. То есть антимикробные пептиды являются, скорее всего, мембран-активными веществами, ингибиторы протеаз, они, понятно, ингибируют протеазы, и это тоже может быть признаком отнесения их к различным подгруппам. Спасибо.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Ну что ж, у нас завершена, запротоколирована основная часть процедуры, теперь переходим к общей дискуссии. Любой из присутствующих может выступить за исключением научного руководителя. Прошу высказываться по мотивам голосования, по любым причинам, по любым поводам. Александр Сергеевич, прошу, по связанным с диссертацией, естественно.

Д. х. н., профессор Арсеньев А.С.:

Во-первых маленький офф. Я теперь немножечко понимаю, почему некоторые члены Российской Академии Наук возражали против объединения с сельскохозяйственной и медицинской Академиями Наук. Но, я надеюсь, что, все таки, это объединение обогатит все стороны в хорошем смысле этого слова. Теперь, по диссертации. Сама диссертация, мне так кажется, она много выше среднего, чем у нас в институте, но сильно отстоит от передовых отделов, допустим отдела, возглавляемого Вадимом Тихоновичем Ивановым или Сергеем Анатольевичем Лукьяновым, по своим качествам. Что мне не понравилось в изложении, да? Не понравилось мне следующее, что какое-то оно такое, сумбурное, много-много методов, много разных приемов, а вот какой-то такой одной идеи, может быть кроме гарпининов, названия, нет. Хотя, с другой стороны, вот Александр Васильевич (Ефимов) не даст мне соврать, что мотив СХЗС и два таких мотива, замкнутых ничего кроме двух спиралей не предполагает.

Д. х. н. Ефимов А.В.:

Нет, не согласен.

Д. х. н., профессор Арсеньев А.С.:

Нет? Значит, я ошибаюсь. Мне так показалось, глядя на структуры. ну, я говорю, не дали соврать.

Д. х. н. Ефимов А.В.:

Нет, ну вы же видели, он показывал, в β -структурных шпильках, там то же самое наблюдается.

Д. х. н., профессор Арсеньев А.С.:

Да? Готов поспорить. Теперь же, когда Александр Васильевич (Ефимов) говорил о том, что много программных средств было использовано, и в диссертации часто мелькало слово дизайн, да? Но, дизайнер это хорошая фамилия,

предполагающая некий интеллект. Я не заметил каких-либо дизайнерских вещей, которые там происходили в процессе выполнения диссертации, когда тем или иным разумным, я повторяю разумным, способом переносилось что-то с одной структуры на другую. Как-то вот это было либо сделано, но не показано, но я не понял, как это было сделано. И наконец я хочу сказать, что мы вот сотрудничали с этой лабораторией и много чего делали, и маленькое вот замечание, структуру сделали, спасибо и ушли, а это не очень здорово, потому что работа совместная, и могли бы быть нормальные корректировки. То что я сейчас слышал по биохимии, мы могли бы кое-чего подсказать, да. Вот, хотелось бы более плотного взаимодействия на будущее. Ну, а так диссертация вполне нормальная, достойная нашего института, публикации в хороших журналах, я думаю, мы должны голосовать за.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо. Кто еще хотел бы выступить? Я не вижу желающих выступить. Тогда мы движемся дальше по процедуре. Даю слово диссертанту. Петр Борисович, вам заключительное слово предоставляется возможность сделать.

Опарин П.Б.:

В своем заключительном слове я бы хотел выразить благодарность во-первых всем тем, кто принимал участие в данной работе, это коллективу нескольких лабораторий. В первую очередь это лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов. Отдельно хотелось бы выразить признательность Егорову Цезию Алексеевичу и Мусолямову Александру Хусаиновичу, а также Рогожину Евгению и Беркут Антонине. Также хотелось выразить благодарность коллективу белков растений НИИ ФХБ МГУ, лично Белозерскому, Дунаевскому и Винокурову. Также хотелось выразить благодарность коллективу лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН, лаборатории протеомики ИБХ РАН и лаборатории токсикологии Католического университета города Левен, также коллективу лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН коллективу лаборатории химии протеолитических ферментов нашего же института. Конечно, отдельную благодарность я бы хотел выразить своему научному руководителю Василевскому Александру Александровичу за руководство и помощь на всех этапах моей работы с самого первого моего дня в стенах лаборатории, а также руководителю нашей лаборатории Гришину Евгению Васильевичу за предоставленную возможность и также ценные научные консультации и руководство. Отдельную благодарность еще раз хотелось бы выразить оппонентам Александру Васильевичу Конареву и Александру Васильевичу Ефимову за проделанную ими работу, за данное согласие на оппонирование, Филлиповой Ирине Юрьевне, которая представляла ведущую организацию и также дала ряд комментариев по поводу моей работы. Спасибо всем пришедшим за проявленное внимание, за интересные вопросы. Также хотелось бы отдельно поблагодарить тех, кто внес основополагающий вклад в мое сегодняшнее выступление – это своих родителей и учителя биологии Горину Валентину Ивановну. Спасибо за внимание.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Спасибо, дальше голосование. Нам нужно избрать счетную комиссию. По традиции я делаю предложение, уже согласованное, без регалий и имен-отчеств: Габиров, Зубов, Олейников. Состав три человека, фамилии назвал. Есть какие-то иные соображения по поводу счетной комиссии? Альтернативные, либо сократить, либо дополнить? Если нет, то прошу проголосовать членов совета за состав счетной комиссии. Кто за? Кто против? Счетная комиссия избрана.

(Проводится голосование.)

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

Теперь, значит, по защитам. Первым у нас защищался Опарин Петр Борисович. Присутствовало на заседании 22 члена ученого совета, роздано бюллетеней - 22, оказалось – 22, «за» - 22. «Против» и недействительных нет.

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Кто-то возражает против утверждения этого протокола? Возражающих нет, протокол утвержден. Поздравим диссертантов.

Теперь мы должны либо согласиться, либо как-то скорректировать проекты заключения диссертационного совета, которые были на руках у членов ученого совета. Есть какие-то замечания по тому, что нам предлагалось?

(Проходит обсуждение, замечаний нет. Проект заключения принимается единогласно)

Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:

Я что-то не вижу. Ну, тогда утверждаем и завершаем на том процедуру. Спасибо всем.

Председатель
диссертационного совета
Академик РАН

Ученый секретарь
диссертационного совета
Доктор физ.-мат. наук



Иванов Вадим Тихонович

Олейников Владимир Александрович