

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

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01

13 марта 2024 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Агаповой Юлии Константиновны

**По теме: «HU белок из *Spiroplasma Melliferum*: структурная организация,
специфичность ДНК-связывания и низкомолекулярные ингибиторы»**

Специальность – 1.5.3. Молекулярная биология

Москва – 2024

СТЕНОГРАММА

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, от 13 марта 2024 года.

Председатель
Диссертационного совета
д.х.н., академик РАН

Мирошников Анатолий Иванович

Ученый секретарь
Диссертационного совета
д.ф.-м.н.

Олейников Владимир Александрович

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 5.

1. Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
3. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
4. Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
5. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
6. Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
7. Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
8. Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
9. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
10. Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
11. Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
12. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
13. Член-корр. РАН, д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
14. Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
15. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
16. Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
17. Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
18. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19. Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Мирошников А.И., председатель: Уважаемые коллеги, начинаем заседание. У нас сегодня защиты кандидатской диссертации по специальности молекулярная биология - это Агапова Юлия Константиновна, «HU белок из *Spiroplasma Melliferum*: структурная организация, специфичность ДНК-связывания и низкомолекулярные ингибиторы», на соисканной ученой степени кандидата биологических наук, научный руководитель Татьяна Владимировна Ракитина, официальные оппоненты Иванов Александр Владимирович, доктор биологических наук, заместитель-директора по научной работе Института молекулярной биологии, Горбачев Алексей Юрьевич, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории протеомного анализа, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Лапухина, ведущая организация - Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора. Пожалуйста, Владимир Александрович.

Олейников В.А., ученый секретарь: *(зачитывает информацию о соискателе и документах, содержащихся в личном деле соискателя)* Так, материалы личного дела: Агапова Юлия Константиновна, Российская Федерация, окончила магистратуру факультета нано-био-информационных и когнитивных технологий Московского Физтеха по специальности «Прикладная математика и физики» в 2017 году. С 2011 по 2017 лаборант-исследователь Курчатовского комплекса природоподобных технологий НИЦ. С 2018 по 2019-ый лаборант-исследователь, с 2019-ого по настоящее время лаборант-исследователь лаборатории «Геномная фабрика» центра геномных исследований Курчатовский геномный центр. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология – отлично. Работа выполнена в лаборатории «Геномная фабрика» центра геномных исследований Курчатовский геномный центр. По научному руководителю уже было сказано: кандидат химических наук Ракитина Татьяна Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории белков гормональной регуляции нашего института ИБХ. По теме диссертации опубликовано 9 статей в рецензируемых журналах. Объявления о защите, автореферат, диссертация размещены на сайте ВАК вовремя - 28 декабря 2023 года, и все необходимые документы в деле есть.

Мирошников А.И., председатель: Вопросы, к Владимиру Александровичу есть? Нет? Юлия Константиновна, пожалуйста, 20 минут для доклада.

Агапова Ю.К.: *(Излагает основные положения диссертационной работы).*

Мирошников А.И., председатель: Спасибо за внимание. Вопросы, пожалуйста. Да, пожалуйста.

Донцова О.А.: У меня вопрос, вот какой. Вот вы нам в начале, во введении, сказали, что эти белки либо гнут, либо не гнут, либо в одну сторону, либо как-то по-другому укладывают ДНК. Это одна из их важных функций. Вот там всякие структуры рисовали, определяли, и всё-таки вот какая их функция? Гнут они, в какую сторону, не гнут, или что. И что для этого надо?

Агапова Ю.К.: Большое спасибо за вопрос. Дело в том, что исторически была представлена одна модель связывания, она была найдена, для HU белка из *Anabena*, из *Staphylococcus aureus*, в *Borrelia burgdorferi*, а потом появилась новая модель связываний, и уже ближе к 2022-2023 году она предстала в таком, более серьезном исполнении. И в результате исследователи предполагают, что как раз вот такая неспецифическая модель связывания, она встречается гораздо чаще, чем классическая модель связывания. Потому что благодаря быстрой кинетики образования этого комплекса, HU белок может спокойно реорганизовать ДНК для ее укладки. Классическая модель скорее встречается в таких процессах, когда происходит какое-то воздействие на ДНК, например, при репарации или при репликации, когда он приходит на то место и изгибает ДНК в необходимую позицию для того, чтобы она взаимодействовала в дальнейшем, с другими белками. То есть он выполняет обе эти функции. И зависит от того, где он необходим. Например, в случае репарации он будет выполнять функцию изгиба. В принципе, известно, что если в ДНК есть какие-то особенности, есть мисмейч или, например, вид репликационной вилки, то данный белок связывается и сгибает ДНК гораздо охотнее. То есть в зависимости от того, какой процесс в данный момент необходим к клетке, такое оно и выбирает, так и связывается.

Мирошников А.И., председатель: Ольга Анатольевна, удовлетворены?

Донцова О.А.: В большей степени, да.

Мирошников А.И., председатель: Еще вопросы? Да, пожалуйста.

Ямпольский И.В.: Можно, пожалуйста. У меня вот микрофон оказался. Подскажите, пожалуйста, еще раз, я, может быть, плохо слушал. Как вы вышли на эти низкомолекулярные ингибиторы?

Агапова Ю.К.: Сейчас. Вообще мы проводили их поиск в коллаборации с коллегами из ООО “Молтех”. Проводилась молекулярная динамика, бралась наша структура. Мы рассматривали конкретный сайт связывания, который мы выбрали исходя из литературных источников. И, прогоняя по базе данных, смотрели, какая энергия необходима для связывания с этим ингибитором. И, опираясь на это, мы выбрали ряд соединений. Там их было десяток, даже больше. После чего мы просто методом EMSA, который достаточно быстро и удобно делается и который у нас на тот момент уже был налажен, смотрели в высоких концентрация ингибиторы, чтобы посмотреть вообще они...

Ямпольский И.В.: Вот вы говорите, для литературных данных, а вот для контекста - уже какие-то известные есть ингибиторы?

Агапова Ю.К.: Да, например транстильбентные производные для *Mycobacterium tuberculosis*. Для них также были рассчитаны IC₅₀ и МИК. IC₅₀ показали хорошие результаты в нашем же диапазоне, 5-10 микромолей. А МИК был чуть повыше, там, в районе 200 микромолей.

Ямпольский И.В.: Ну, это разве вот рабочий диапазон, в принципе, если рассматривать их как препараты?

Агапова Ю.К.: IC₅₀ вполне. МИК немного высоковат, но это все равно тот порядок, который можно встретить в литературе. Тут скорее вопрос, что конкретно именно эти соединения, они все-таки требуют оптимизации и доработки, чтобы какие-то другие дальнейшие действия с ними проводить. Мы провели первые шаги, минимальные исследования, которые показали, что такие формы, в принципе, рабочие. Но, да, оптимизировать их, конечно, дальше нужно. По крайней мере, если мы планируем продолжить работу в этом направлении, что-то более серьезное, их нужно доработать.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Еще вопросы? Да, пожалуйста. Там микрофон стоит.

Завриев С.К.: Я знаю, знаю. Слышно, да? Я что хотел вас спросить. Вот вы связывание смотрели на разных структурных, так сказать, вариантах ДНК, да? Вот если вернуться к этому слайду. У меня такой... Вот это да, там, это все понятно. А у вас какое-нибудь было исследование, зависит ли это от структуры ДНК, в смысле я имею в виду не пространственной, а пар оснований, так сказать, последовательности там, сколько АТ пар, сколько ГЦ пар, какие так сказать, и потому что это принципиально, я думаю, может оказывать свойство на связывание. Вот вы нигде не приводили структуры нуклеиновой кислоты и вот у меня вопрос, связана ли эффективность связывания со всеми этими структурами, со всеми последовательностями ДНК?

Агапова Ю.К.: Да, спасибо большое за вопрос. К сожалению, именно такой задачи мы перед собой не ставили. Мы ставили задачу посмотреть этот профиль в одних условиях. ГЦ состав наших олигонуклеотидов был в районе 50% подобран. Но исследование о зависимости от АТ или ГЦ состава...

Завриев С.К.: 50% в смысле пары, да? АТ или ГЦ пары?

Агапова Ю.К.: Да, примерно.

Завриев С.К.: А длина?

Агапова Ю.К.: Длинна от 24 до 48. Ну, там еще 21 было. В основном 48. Вот все эти на основе 48 пар оснований.

Завриев С.К.: А длины фрагмента это никак не зависит, да? Там было бы 48 или 148, связывание было бы одинаково?

Агапова Ю.К.: Да, в данном случае мы...

Завриев С.К.: Вы проверяли это?

Агапова Ю.К.: Тут скорее зависит от подбора условий. Нам необходимо было подобрать так, чтобы... То есть если мы добавим много белка и ДНК будет достаточной длины, то мы увидим не один комплекс связывания, а несколько, что логично. Но нам в экспериментах было важно добиться именно одного комплекса, то есть мы подбирали так, чтобы это был один комплекс, чтобы воспользоваться формулой для расчётов.

Завриев С.К.: А структурно вы просто сделали рандомную такую последовательность, с длиной 48?

Агапова Ю.К.: Да, да, более-менее классическую.

Мирошников А.И., председатель: Ладно, спасибо. Спасибо. Ещё вопросы? Не вижу. А, пожалуйста, Сергей.

Козлов С.: Здравствуйте, спасибо за доклад. У меня вот чисто такой практический вопрос. Опять же, возвращаясь к актуальной теме антибиотика, насколько по механизму действий HU белки можно отнести к цитолитикам или к цитостатикам? То есть, если мы функцию этого белка из клетки убираем, что будет с микроорганизмом происходить?

Агапова Ю.К.: С микроорганизмом были проведены исследования, что клетка умирает. Ну, это происходит в случае микоплазм, потому что у них нет других НАБ-ов, которые могли бы заменить функции именно HU белка. Например, в случае *Escherichia coli*, в которой присутствуют другие "histon-like" белки, нокаут HU белка к подобному эффекту не приведет. Мы этот эффект тоже проверяли, ингибиторы добавлялись к клеткам из *Escherichia coli*. И там никаких изменений не наблюдалось.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Ещё вопросы? Пожалуйста.

Корнеенко Т.В.: Добрый день. Вы нам представили структуру белка HUSpm. Однако у вас там несколько белков. Можете ли вы что-то рассказать о структуре, например, HUMgal? То есть какого-то другого белка? И проводили ли вы исследования структурные?

Агапова Ю.К.: Да, спасибо большое за вопрос. Действительно, в рамках структурных исследований мы больше сосредоточились на HU белке из *Spiroplasma melliferum*, потому что получилось расшифровать структуру. Однако HU белок из *Mycoplasma gallisepticum* мы тоже брали не просто так. Мы знали, что у него уменьшено количество фенилаланинов в последовательности. Также мы знали, что на N-конце у него также дополнительное удлинение из 6-минокислот. Таким образом, нам тоже было интересно получить его структуру, но, к сожалению, несмотря на то, что мы даже получили кристаллы HUMgal и

сняли какие-то данные, расшифровать их не удалось. Поэтому была депонирована только одна структура, на которой мы сосредоточили свое внимание.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Еще вопросы? Спасибо. Отдохните. Пожалуйста, Татьяна Владимировна.

Ракитина Т.В., научный руководитель: Уважаемые члены совета, коллеги, значит. Юлия Константиновна пришла работать в НИЦ Курчатовский институт, тогда это была “Лаборатория белковой фабрики” еще, в ранние студенческие годы, во время бакалаврской работы она овладевала методами, участвовала в различных проектах, но уже где-то на этапе магистерской работы основной сферой ее интереса в научной стали гистонopodobные белки. И эту работу она продолжила уже после поступления в аспирантуру. Работа достаточно разнообразная, то есть тут и структурные, и функциональные исследования, и на самом деле объект достаточно интересный. Что-то мы, конечно, может быть, планировали развить более глубоко, но не удалось. Но Юля за период этой работы проявила себя как очень вдумчивый, очень аккуратный исследователь, который способен организовать и рабочее место, и какой-то рабочий процесс, и собрать в рамках какой-то задачи достаточно достоверные данные. Вот эти все EMSA – это многочисленный повторы и довольно трудоемкий метод. Она очень трудолюбива, очень организована. Я считаю, что вполне заслуживает степени кандидата биологических наук и в дальнейшем приложит свои умения и знания к другим проектам. Вот еще немножко проблема у нее, что работа была сделана достаточно давно, она немножко переключилась, и поэтому немножко теряется на простых вопросах. А вообще она очень...

Мирошников А.И., председатель: Да не теряется. Ну, молодец.

Ракитина Т.В.: Ну, то есть вполне достойна запрашиваемой степени.

Олейников В.А., ученый секретарь: Эта работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении национальный исследовательский центр Курчатовский институт. И поэтому заключение, которое у меня в руках, это как раз заключение той организации, где выполнена работа (*зачитывает положительное заключение организации, где выполнялась работа*). Ну, как уже сказано, лаборатория, геномная фабрика, биографические данные уже были как-то представлены. Значит, кандидатский экзамен, справка выдана еще в 23-м году. Вот эта работа была обсуждена опять же еще летом 23-го года на заседании научно-технического совета Курчатовского комплекса НБИКС природоподобных технологий. Значит, соответственно, рассмотрено. И результат фактически это рекомендация диссертации к защите. Ну, опять же, так сказать, пока указана здесь актуальность темы, обосновывается актуальность темы исследования. Он как раз... Говорится о том, что неким препятствием является отсутствие пространственных структур этих белков микоплазменного происхождения, которые необходимы для

соответствующих приложений и создания новых подходов. Формулируются цели и задачи в этом отзыве. Научная новизна: проведен биоинформатический анализ нескольких тысяч гистоноподобных белков. Сравнительный анализ пространственной структуры HUSpm белков. Были обнаружены новые ингибиторы HU белков. Практическая значимость. Опять же значительный личный вклад автора, полученный лично автором или при его непосредственном участии все результаты. Достоверность не вызывает сомнения. Публикации в девяти статьях в рецензируемых журналах перечислены соответственно эти статьи. Более чем 20 научных конференций. Ну, и заключение принято на заседании научно-технического совета Курчатовского комплекса НБИКС природоподобных технологий. Присутствовало 22 человека, результаты голосования единогласно, и соответственно подписано заместителем председателя этого совета доктором физмат наук Кашкаров. Ну и соответственно утверждено первым заместителем директора по науке НИЦ Курчатовский институт Дьяковой Ю.А. Это заключение организации, где выполнена работа.

Теперь отзыв ведущей организации (*зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный*). Ведущей организацией был, соответственно, Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины. Опять же, актуальность темы диссертации рассматривается и подтверждается. Научная новизна исследования, значит, высокая степень новизны и оригинальности. Был проведен биоинформатический анализ нескольких тысяч гистоноподобных белков. С использованием метода виртуального скрининга были обнаружены и получены новые ингибиторы HU белков. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с использованием современных методов. Значит, научно-практическая значимость – описана первая пространственная структура этого белка – спироплазмы. Структура и содержание работы – 109 страниц. Литература, соответственно, список литературы 164 наименования. Ну и вот, значит, та часть, которую я зачитаю полностью, это замечание по содержанию диссертации.

Диссертантам в своей работе был сделан акцент на изучение HU белков четырех разных микроорганизмов молликут, двух представителей класса не прочитаю, к сожалению, отсутствует название 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.

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.

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).

При расчете констант диссоциации были ли взяты во внимание данные об аномальном содержании АТ-оснований в молликутах?

При создании мутантных вариантов HU-белка проводился ли контроль сохранности правильной их вторичной и третичной структуры физическими (снятие КД-спектра) и/или расчетными методами?

Для оценки влияния ингибиторов на рост *Mycoplasma gallisepticum* и *Spiroplasma 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.

Однако, несмотря на сделанные замечания, несомненно, работа Агаповой Ю.К. является интересным законченным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. Ну и наконец, заключение, что работа, соответствует критериям, установленным положениями ВАК, о присуждении учёных степеней, а диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени. Отзыв подготовила Дарья Сергеевна Матюшкина, это кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, и утверждён отзыв директором ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора, доктор биологических наук, профессор, академик РАН Вадим Маркович Говорун.

Мирошников А.И., председатель: Так, а отзывы на автореферат есть?

Олейников В.А., ученый секретарь: А потом отзывы. Ну, пусть ответит?

Агапова Ю.К.: Спасибо большое ведущей организации за данный отзыв. Отвечая на вопрос. Во-первых, немного подробнее, почему мы выбрали именно данные объекта исследования. Нам были интересны HU белки из молликут. Также мы хотели взять белки, которые имели какие-то явные отличия от наиболее хорошо изученного HU белка из *Escherichia coli*. Отобранные белки данным критериям удовлетворяли. Про HUSpm я говорила в презентации, то, что там было повышенное число фениланиновых остатков и наличие дополнительной вставки, для *Mycoplasma gallisepticum* так же предварительно были найдены особенности, с низким содержанием фениланинов в последовательности и дополнительное удлинение на конце. Ну и чуть больше про гомологию. HU белок из *Neisseria gonorrhoeae* был гомологичен HU белку *Escherichia coli* больше всего, на 60 процентов. У HUSpm и HUMgal данная гомология составляла уже 30 и 20%. Также про термостабильность. Почему у нашего белка была найдена термостабильность, хотя он обитает в организме, мезофила? Скорее всего, это связано с какой-то, исходной целью. Не то, чтобы белок не был термостабилен. В принципе, в литературе часто встречаются найденные белки, которые обладают термостабильностью, но находятся в мезофильных или даже психофильных организмах. Скорее всего, это связано с его устойчивостью каким-то другим фактором, например, фактором среды, pH, ионной силе, каких-то органических соединений, а уже как следствие, так как он упрочнил структуру для противодействия этим факторам, он также приобрел свою термостабильность. По поводу метода, здесь мы согласны. Наш метод нас устраивал, потому что он был нагляден, он был хорошо представлен в научной литературе, в том числе и современной. Он позволял подтвердить, что полученные рекомбинантные белки активны и позволял провести сравнение их активности в модельном эксперименте. Однако мы согласны, что, возможно, этот метод стоило расширить. Например, есть метод теплофореза, который бы помог нам, провести исследование с температурной точки зрения, в том числе вот упоминается, что у HUSpm и HUMgal разные температуры, где они обитают, и соответственно с помощью него мы могли бы расширить эту область исследования, тем самым получив более интересные результаты. Также про аномальное содержание АТ оснований у молликут. Тут я уже кратко отвечала, что данной задачи перед нами не стояло. Мы сравнивали белки на одной модельной системе. То есть константы диссоциации рассчитывались для конкретных комплексов с конкретными олигонуклеотидами. Для них ГЦ состав был подобран в районе 50%. Также про контроль, сохранение правильной вторичной и третичной структуры. Естественно, перед постановкой эксперимента мы тщательно следили, какие мутации мы делаем. Но помимо этого мы, снимали кд-спектры полученных мутантов и сравнивали их с кд-спектрами с HU белком дикого типа. И с замечанием по

поводу того, что эксперимент с проведением минимальных ингибирующих концентраций можно было сделать лучше, я также полностью согласна. Вроде бы я прошла по всем вопросам.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Пожалуйста, Владимир Александрович.

Олейников В.А., ученый секретарь: Теперь, в совет поступили два отзыва на автореферат. Отзывы положительные полностью. Поэтому я просто хочу сказать, что первый отзыв из Института биохимии имени Баха, подписан кандидатом биологических наук, старший научный сотрудник - Юркова Мария Сергеевна. И второй отзыв тоже полностью положительный, совершенно подчёркивается, что высокого уровня, полностью соответствует различным критериям. Это Ротанова Татьяна Васильевна, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов нашего института, института ИБХ.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, Владимир Александрович. Александр Владимирович прошу прощения, что я поспешил. Пожалуйста, вам слово.

Иванов А.В., оппонент: *(излагает отзыв, отзыв положительный)*. Добрый день, огромное спасибо за приглашение. Я постараюсь покороче. Работа абсолютно замечательная, работу мы выслушали, она посвящена HU белкам микоплазм, был проведен биоинформатический анализ в работе, предложен алгоритм для классификации белков к одному из трех типов, представлен метод наработки этих белков в бактериях, выделение белков и получение кристаллов, решена структура одного белка с очень высоким разрешением, что позволило провести работу. Исследовано взаимодействие этих белков с различными ДНК комплексами различной структуры. Причем сделано это достаточно трудоемким, не скажу что старым методом, скажу классическим методом EMSA, торможение в геле. И проведен виртуальный скрининг ингибиторов, выбранные молекулы, которые были перспективными, потенциальными ингибиторами взаимодействия этих HU белков с ДНК. Показано, что эти молекулы действительно являются ингибиторами и подавляют рост самих микобактерий. Так что работа абсолютно четкая, красивая и все выводы полностью основаны на представленных экспериментальных данных. К тексту работы практически нет никаких замечаний, есть, ну понятно, несколько опечаток, есть определенные технические вопросы скорее к разделу материалы и методы. Вопросы, которые я задал в отзыве, уже получили ответ в ходе доклада. Первый вопрос связан опять же с выбором метода исследования взаимодействия белков с ДНК, метод торможения в геле. Почему не был использован более простой метод по дот-блоту, когда можно делать большее количество анализов просто фильтрованием меченой ДНК в комплексе с белками через мембраны. Опять же автор ответил на этот вопрос. Отсюда же следовал другой вопрос о возможной стехиометрии

взаимодействия. Может ли несколько молекул белков взаимодействовать с одной молекулой ДНК? И есть ли какая-то кооперативность? Диссертант тоже представил ответ и показал данные по изотермической калориметрии тестирования. Ну и наконец, можно было бы немножко больше охарактеризовать методы выделения белков и получения этих продуцентов, в частности, такие журналы, как Protein Expression Purification, обычно требуют таблицу с выходами каждого из препаратов с литро-клеточной культуры, но это опять же является пожелание. В целом, естественно, работа полностью соответствует требованиям положения о присуждения ученой степени, утвержденной постановлением правительства Российской Федерации. Диссертант, несомненно, заслуживает присвоению искомой степени кандидата биологических наук по заявленной специальности.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, Александр Владимирович. Ну, насколько я понял, отвечать не на что. Да, все, спасибо большое. Так, второй оппонент онлайн. Горбачев Алексей Юрьевич.

Олейников В.А., ученый секретарь: Да, он на связи.

Горбачев А. Ю., оппонент: Добрый день, уважаемые коллеги. Меня слышно?

Олейников В.А., ученый секретарь: Да.

Горбачев А.Ю.: *(излагает отзыв, отзыв положительный)*. Большое спасибо за возможность представить отзыв на диссертацию Агаповой Юлии Константиновны. Несколько слов об актуальности выполненной работы. Уже и сам диссертант, и другие коллеги много сказали об актуальности. Я бы хотел, не зачитывая весь текст, остановиться на двух моментах. Действительно, гистоноподобные белки, такие как HU белок, в отличие от многих других нуклеоид ассоциированных белков, имеют широкую представленность среди всех известных бактерий. А для микоплазм являются компонентами так называемого корового генома, то есть гены, которые кодируют у белки, являются необходимыми для выживания бактерий класса молликут. Кроме того, насчет самих бактерий класса молликут, в том числе микоплазм, на сегодняшний день это действительно очень актуальная тема, поскольку в странах Европейского Союза и в нашей стране наблюдается эпидемия микоплазменной пневмонии. Помимо того, что она широко распространена, эти бактерии очень тяжело поддаются лечению известными антибиотиками, в частности потому, что у них нет клеточной стенки, кроме того, они являются внутриклеточными паразитами и к ним достаточно тяжело... Антибиотики имеют малую доступность к микоплазмам. Таким образом, работа действительно является актуальной и современной. Что касается научной значимости и практической значимости, действительно в ходе работы получена пространственная структура впервые для HU из *Spiroplasma melliferum*, и найдены новые ингибиторы, которые могут служить в будущем объектами для разработки новых

антимикробных препаратов, направленных непосредственно на микоплазменную инфекцию. Что касается степени обоснованности и достоверности научных положений и выводов сформулированной диссертации, для получения данных был использован широкий диапазон методов, в том числе методы бионформатики. Как уже сказали коллеги, классический метод торможения ДНК в геле, я здесь тоже не согласился бы с выводами ведущей организации насчёт того, что этот метод архаичный, он всё ещё широко распространён и довольно современный. Результаты работы были опубликованы в 9 статьях и представлены на 18 российских и международных конференциях. И кроме того, получен один патент. Таким образом, автор выполнил все необходимые ключевые показатели для присуждения степени кандидата наук. Что касается оценки, содержание диссертации, она построена по традиционному плану. Имеет часть, связанную с результатами, с описанием методов, а также имеет хорошо структурированные выводы. Я позволю себе не зачитывать полный текст, но вот на замечаниях по диссертации останусь подробнее. В результате были сформулированы несколько замечаний и вопросов. Первый, формулировки задач и выводов. Имеются некоторые расхождения. Первой задачей автор ставит, процитирую дальше, - “Отбор модельных HU белков для функциональных исследований”. При этом в выводах прямо не говорится, что такой отбор был осуществлен и на основании каких параметров он был осуществлен. Хотя это понятно по смыслу, но, на мой взгляд, непосредственно в формулировке выводов это было бы неплохо отразить. Я бы сказал, что это формальная погрешность. Второе замечание. В тексте диссертации было допущено несколько пунктуационных ошибок, пропущенные необходимые знаки препинания. Это, наверное, можно отнести скорее к опечаткам. Третье замечание. Некоторые из представленных рисунков имеют подписи на английском и русском языке одновременно. На мой взгляд, имеет смысл полностью русифицировать подписи к рисункам и допускать одновременное употребление двух языков. Четвертое замечание. 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. То есть в данном случае имеет место тавтология. Опять же, это скорее формальная погрешность, но, тем не менее, стоит здесь употреблять либо одно, либо другим, а не оба сразу. Ещё одно замечание и на его основании вопрос. 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 *Spiroplasma 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? И еще раз хотел бы отметить, называть спироплазму микоплазмой с точки зрения систематики не совсем корректно. И также на этот вопрос уже были даны ответы, но всё-таки я ещё раз его сформулирую. Насколько значения полученных констант связывания ингибиторов, найденных в работе, позволяют рассматривать данные соединения в качестве потенциально терапевтических? На мой взгляд, микромолярные концентрации – это довольно высокие значения для возможного применения в терапии. Но не смотря на все приведенные замечания и вопросы, данная работа заслуживает обще положительной оценки. И диссертационная работа «HU белок из *Spiroplasma melliferum*: структурная организация, специфичность ДНК–связывания и низкомолекулярные ингибиторы» соответствует критериям, установленным положением о присуждении учёных степеней. Сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Большое спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, Алексей Юрьевич. Юлия Константиновна, давайте, отличайте.

Агапова Ю.К.: Спасибо большое за предоставленный отзыв. В той или иной степени я затрагивала ответы на вопросы, которые указаны в отзыве. Во-первых, я полностью согласна с замечаниями касательно оформления. В диссертационной работе нужно было быть более внимательной. Почему было сосредоточено внимание на изучение именно *Spiroplasma melliferum*? Мы согласны с тем, что если бы мы взяли в исследование HU белок, который был патогеном, человека, это поставило бы перед нами более интересную задачу. Однако, к сожалению, на тот момент у нас не было ни опыта, ни места, где мы могли бы проводить исследование патогена человека, поэтому мы сосредоточились на более приземленных вещах, связанных с особенностью структур микоплазм, то, что для них не было получено ни одной пространственной структуры. Так как изначально мы, в принципе планировали кристаллизовать белки, все белки, которые мы получали. Ну и вопрос касательно ингибиторов. Действительно микромолярный диапазон значений МИКа достаточно высок, несмотря на то, что в литературе встречаются значения и выше. Но, как я говорила, конкретно эти соединения, разумеется, требуют доработки и оптимизации, потому что в том виде, в котором они представлены сейчас, проводить эксперименты с какими-то более серьезными терапевтическими целями не представляется возможным. Нужно дорабатывать, нужно оптимизировать, взяв за основу те результаты, которые мы получили, чтобы получить хороший результат. На этом вроде бы все. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Коллеги, формально мы должны объявить дискуссию. Сейчас желающие выступить. Не вижу. Тогда, что у нас следующее? Тогда заключительное слово. Юлия Константиновна.

Агапова Ю.К.: Во-первых, я хотела бы поблагодарить членов диссертационного совета, которые предоставили мне такую возможность познакомиться с данной работой. В работе в данном направлении я уже нахожусь достаточно давно. Это мое продолжительное, длинное знакомство с НУ белками. На протяжении выполнения всех работ я находилась под научным руководством Ракитины Татьяны Владимировны. Очень хочу поблагодарить ее за ценные советы и за поддержку на всех этапах диссертационной работы. Также хочу поблагодарить Камашева, Дмитрия Эдуарда, за инициацию данной работы, и как идейного вдохновителя, в принципе. Он также давал много ценных советов и помогал в проведении биоинформатического анализа. Также хочу поблагодарить Николаеву, Алену Юрьевну, за получение кристаллов исследуемых белков, за сбор и обработку дифракционных данных. Также Клеменова Сергея Юрьевича за помощь в проведении эксперимента по ДСК и Корженевского Дмитрия Андреевича за проведение эксперимента ИТС. Также Стройлов Виктор Сергеевич и Зейфман Алексей Александрович помогли в проведении молекулярного докинга и скрининга химической библиотеки, и активно помогали в поисках ингибиторов. Тимофей Владимир Игоревич помогал в проведении молекулярно-динамических исследований, и Ванюшкина Анна предоставила микоплазменные клетки, и помогла поставить эксперименты, потому что в нашей лаборатории изначально не было условий, необходимых для проведения данных экспериментов, а под ее тщательным контролем нам удалось рассчитать МИК. Я очень благодарна за работу с данными людьми. Я надеюсь, что в дальнейшем наши коллаборации и работы тоже будут такими плодотворными. Большое спасибо за поддержку на всех этапах моей работы.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Так, коллеги, нам нужно счетную комиссию избрать. Согласились в счетную комиссию войти Алексей Анатольевич Белогуров, Владимир Виленович Безуглов и ученый секретарь. Возражения нет? Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Ну что, господа, давайте проголосуем.

(Идет тайное голосование)

Олейников В.А., ученый секретарь: Так, счетная комиссия закончила свою работу, и я объявляю результаты голосования. Значит, по диссертации Агаповой Юлии Константиновны присутствовало на заседании 20 членов диссертационного совета, роздано бюллетеней 20, оказалось в урне 20, за 20, против и недействительных нет. Ура! Поздравляю.

Мирошников А.И., председатель: Хорошо поработали.

Олейников В.А., ученый секретарь: Так, голосуем за утверждение.

Мирошников А.И., председатель: Так, коллеги, по поводу проекта заключения совета, есть ли какие-то вопросы?

(Генералова А.Н. сообщает о незначительных редакторских правках тексте заключения. С учетом этого диссертационный совет единогласно принимает заключение)

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, коллеги. Заседание закрыто.

Председатель
диссертационного совета



(Handwritten signature of A.I. Miroshnikov)
академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

(Handwritten signature of V.A. Oleynikov)
д.ф.-м.н. Олейников В.А.