

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 24.1.037.01 при ИБХ РАН
13 марта 2024 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Петренко Дмитрием Евгеньевичем

По теме «Изучение бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans*
с применением рентгеновских методов»

Специальность – 1.5.3 – молекулярная биология

Москва – 2024 г.

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 13 марта 2024 года.

Председатель
диссертационного совета

акад., д.х.н. А.И. Мирошников

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. В.А. Олейников

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. | Шахпаронов Михаил Иванович | (1.4.9) |
| 20. | Д.х.н. | Ямпольский Илья Викторович | (1.4.9) |

Мирошников А.И.:

Уважаемые коллеги, начинаем заседание. У нас сегодня защита кандидатской диссертации по специальности молекулярная биология Петренко Дмитрия Евгеньевича, научный руководитель - Татьяна Владимировна Ракитина. «Изучение бактериальной олигопептидазы с применением рентгеновских методов», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по молекулярной биологии, официальные оппоненты: Морозова Елена Андреевна, кандидат химических наук из института Молекулярной биологии, и Лунин Владимир Глебович, доктор биологических наук из Центра эпидемиологии и микробиологии имени Гамалеи, ведущая организация МФТИ. Пожалуйста.

Олейников В.А.:

Дмитрий Евгеньевич Петренко, гражданин Российской Федерации. Магистратуру окончил Физтеха в 2017 году по специальности «Прикладные математика и физика». С 2017 по 2019 - лаборант-исследователь лаборатории «Белковая фабрика» Курчатова комплекса НБИКС природоподобных технологий, НИЦ «Курчатowski институт». С 2019 по настоящее время лаборант-исследователь лаборатории «Геномная фабрика» Курчатова института. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология – отлично. Работа выполнена в этой лаборатории: «Геномная фабрика» центра геномных исследований «Курчатowski геномный центр» НИЦ «Курчатowski институт». Опять же, научный руководитель - кандидат химических наук Ракитина Татьяна Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории белков гормональной регуляции Института биоорганической химии, нашего института. По теме диссертации опубликовано 8 статей. Объявления о защите автореферата размещены на сайте ВАК 28 декабря 2023 года. Все документы есть.

Петренко Д.Е.:

Добрый день, уважаемые члены Диссертационного Совета, уважаемые слушатели. Меня зовут Петренко Дмитрий Евгеньевич, и я хочу представить свою работу на тему «Изучение бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* с применением рентгеновских методов» (*излагает основные положения диссертационной работы*)

Мирошников А.И.:

Спасибо. Вопросы? Коллеги, вопросы. Не вижу. Вопросы?

Олейников В.А.:

Можно я спрошу?

Мирошников А.И.:

Да, спросите.

Олейников В.А.:

Скажите, пожалуйста, а вот у вас везде кристаллическая форма. В исследованиях вы рентгеноструктурный анализ использовали, а вот насколько есть уверенность, что кристаллическая форма и нативная форма соответствуют друг другу?

Петренко Д.Е.:

Спасибо за вопрос. Именно из-за этого мы проводили ещё и исследования методом малоуглового рентгеновского рассеяния, то есть исследовали поведение фермента в растворе. И там было получено, что фермент принимает конформацию, которая не совсем соответствует именно кристаллическим структурам. В кристаллических структурах фермент

занимал промежуточную и закрытую конформацию, а в растворе наблюдалась преимущественно конформация открытая и с примесями промежуточной.

Олейников В.А.:

Нет, но это не ответ на вопрос, потому что рентгеноструктурный анализ даёт вам фактически распределение атомов. а малоугловое - некую общую форму частицы белковой, которой вы изучаете. Это совершенно разные методы и разные результаты.

Петренко Д.Е.:

Да, я с вами согласен. Это, скорее, комплементарные методы, потому что малоугловое рассеяние нам не позволило получить структуру, но при этом оно позволило именно определять конформации. То есть более масштабные какие-то изменения в ферменте.

Олейников В.А.:

А вот малоугловое, каким образом вы восстанавливали фактически вот эту форму?

Петренко Д.Е.:

В данной работе это не проводилось, здесь наоборот было проведено сравнение с теоретически рассчитанными кривыми для кристаллических пространственных структур. То есть мы смотрели, как в малоугловом рентгеновском эксперименте вел бы себя белок, который принимает такую же конформацию, как в кристаллических структурах.

Олейников В.А.:

А где сопоставление, чтобы экспериментально намерили?

Петренко Д.Е.:

Сопоставление. Пунктирные линии – это, собственно, модели, а сплошные линии – это экспериментальные кривые.

Олейников В.А.:

То есть фитинг не хороший.

Петренко Д.Е.:

Как я уже сказал, да, фермент принимает не открытую конформацию, но с примесями. То есть присутствуют какие-то примеси.

Олейников В.А.:

Понятно.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Ещё вопросы? Не вижу. Спасибо. Татьяна Владимировна, идите хвалить.

Ракитина Т.В., научный руководитель:

Добрый день. В отличие от Юлии Константиновны, Дмитрий Евгеньевич приступил к выполнению своей работы только на втором году аспирантуры.

Мирошников А.И.:

А в первый год что он делал?

Ракитина Т.В.:

Магистерскую работу, бакалаврскую и первый год аспирантуры он работал в другой лаборатории, занимался электронной микроскопией, точнее расшифровкой результатов

электронной микроскопии, но в связи с какими-то чисто административными перестройками, у него ушёл руководитель, поменялись тематики, его оказалась никому не интересной, и, в общем, стал вопрос о том, что он нуждается в руководителе.

Мирошников А.И.:

И вы его подобрали?

Ракитина Т.В.:

Да, а у нас на тот момент уже шла работа по олигопептидазе, которую не удавалось закристаллизовать, хотя у нас было много моделирования, были интересные мутанты, то есть даже был грант, и да, мы его подобрали, потому что нам не хватало рук, а у него был всё-таки опыт структурной работы. И это сложилась очень удачная комбинация, потому что как раз с его приходом у нас случился некий прорыв. Нам удалось подобрать условия кристаллизации, у нас удалось получить довольно много рентгеноструктурных данных. И, собственно говоря, вот он оставшиеся годы аспирантуры занимался расшифровкой, получал дополнительные мутанты, занимался той работой, которую он рассказал. И статьи мы даже публиковали уже по окончании его аспирантуры, потому что начал он довольно поздно, но за очень короткий срок сумел овладеть всеми методами, начиная от молекулярной биологии, от выделения рекомбинантных белков, какой-то энзимологической характеристики. И были проведены вот эти все структурные эксперименты, точнее кристаллизовали в НИЦ «Курчатовский институт», а уж снимали, где придется. И вот он занимался решением, уточнением структур, моделированием, динамикой. И малоугловые данные, там, с помощью коллег, обрабатывал. У него прогресс за эти годы был очень большой, и он тоже стал сложившимся учёным, который помимо экспериментальных методов владеет очень широким спектром моделирования и структурных методов, структурной биологией.

Мирошников А.И.:

То есть вы им довольны?

Ракитина Т.В.:

Да, я им довольна, очень довольна, и он без сомнения заслуживает запрашиваемой степени.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Владимир Александрович, докладывайте.

Олейников В.А.:

(Зачитывает положительное заключение организации, где выполнялась диссертация). Так, ну опять же, работа выполнена в Национальном исследовательском центре Курчатовский институт. И, соответственно, у меня в руках заключение этой организации. Биографические данные я повторять не буду, потому что в начале они были оглашены. Соответственно, значит, работа была рассмотрена на семинаре в НИЦ «Курчатовский институт» и принято заключение о том, что выполнена работа на высоком научном уровне, полностью соответствует требованиям и рекомендуется к защите.

Актуальность темы исследования. Ну, по актуальности мы уже услышали сегодня в докладе фактически, но, в частности, фразу зачитаю: поиск альтернативных структурных мотивов, регулирующих каталитическую активность OpV бактерий, соответственно, был затруднён отсутствием пространственных структур этих ферментов. Ну то есть это получение пространственных структур является актуальной задачей. Соответственно, цели, научная новизна, теоретическая и практическая значимость этой работы. Здесь, так сказать, отражено в заключении, личный вклад, все результаты, основные, получены лично автором или при его непосредственном участии. Достоверность сомнений не вызывает. Опубликованы в восьми статьях в рецензируемых хороших журналах. Большое количество докладов было

сделано. Ну и на семинаре заключение принято. Присутствовало там 26 человек. Против нет. Все единогласные голосования. И подписано заместителем председателя научно-технического совета Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий доктор физ.-мат. наук Кашкаров. А утверждено соответственно первым заместителем директора по науке НИЦ Курчатовский институт Дьякова Ю.А. Это что касается заключения организации, где была выполнена работа.

Теперь отзыв ведущей организации, в качестве которой выступал Московский физико-технический институт. (*Зачитывает положительный отзыв ведущей организации*). И, соответственно, опять же, актуальность, подчёркивается, что работа весьма актуальна, что научной новизны - автором впервые были получены и охарактеризованы пространственные структуры бактериальной OpV из *Serratia proteamaculans* дикого типа и ряда других. Научно-практическая значимость. Опять же влияние модификации шарнирного пептида на каталитическую активность, получение новой структуры. Все это практически значимо. Достоверность работы. Подчеркивается, что современные методы, структура и содержание работы построены по традиционной схеме, работы, описано прямо по главам, соответственно, то, что сделано в этой работе. Замечание и вопросы.

В докладе не были представлены характеристики полученных дифракционных данных, а также значения основных параметров, характеризующих качество, проведённое автором обработки дифракционных данных. Второе, при описании экспериментов по снятию дифракционных данных не были указаны конкретные названия и характеристики используемых экспериментальных установок. Третье. Диссертантом не было раскрыто, как проводился выбор стабилизирующих агентов, какова возможная природа стабилизация PSP спермином. Не было обсуждено, какой возможный функциональный смысл имеет промежуточная конформация PSP. На рисунках, демонстрирующих электронную плотность лиганда, не разъяснено, на каком уровне и какого типа карты, представленные вокруг лиганда, и содержит ли плотность кристаллографический баяс от модели. Отмеченные замечания не снижают общий высокий уровень работы, а сама работа, в заключении пишется, что соответствует всем положениям ВАК, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата наук. Ну и соответственно, отзыв обсужден, одобрен на расширенном научном семинаре Центра исследования молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний МФТИ. Подписано, кандидат физ.-мат. наук Борщевский В.И. и кандидат физ.-мат. наук Ремеева А.А. Он, соответственно, утвержден проректором по научной работе Баганом Виталий Анатольевич.

Мирошников А.И.:

Спасибо.

Олейников В.А.:

Замечания были, да. Пожалуйста

Петренко Д.Е.:

Большое спасибо ведущей организации за предоставленный отзыв. Хочется отметить, что некоторые замечания скорее относятся к докладу, чем к самой диссертации. В частности, данные расшифровки дифракционных структур в диссертации присутствуют. И вот они представлены на слайде. Также характеристика использованного оборудования. По следующему замечанию, что не было раскрыто, как проводится выбор стабилизирующих агентов. Собственно, анализ проводился методом дифференциальной сканирующей флуориметрии, которая основана на добавлении красителя, который способен связываться с гидрофобным ядром белка. Поэтому при тепловой денатурации происходит разворачивание гидрофобного ядра, и при связывании красителя увеличивается выход флуоресценции. Таким образом, можно наблюдать в реальном времени и определять температуру тепловой денатурации белка. Исследование проводилось с изменениями различных параметров, таких

как рН раствора, ионная сила, добавление различных анионов, детергентов, изменение вязкости раствора, а также специальных добавок из специального набора для определения термостабильности белков. Почему в присутствии полиаминов увеличивается термостабильность? Это, скорее всего, связано с тем, что положительно заряженные аминокислотные группы нивелируют отрицательные заряды на поверхности белка, и это может способствовать кристаллизации фермента. Следующий вопрос был про возможный функциональный смысл промежуточной конформации PSP. В открытой конформации домены разобщены между собой и в полость между ними способны проникать крупные субстраты. В промежуточной и закрытой конформации доступ крупных субстратов затруднен либо невозможен. При этом в промежуточной конформации, как было показано, расстояние между доменами несколько выше, чем в закрытой. Принимая во внимание, что переход в промежуточную конформацию либо вызывается присутствием субстратоподобных молекул, в данном случае спермина, либо, наоборот, спермин препятствует переходу из промежуточной конформации в открытую. В любом случае присутствие спермина в некотором роде имитирует состояние фермента в клетке, где также присутствует большое количество всевозможных полиаминов и низкомолекулярных компонентов. И можно сказать, что, возможно, это механизм регуляции активности фермента в отношении высокомолекулярных крупных субстратов.

Мирошников А.И.:

Хорошо.

Петренко Д.Е.:

Ну и последнее про электронную плотность лиганда. Карты электронной плотности представлены $2f_0$ - f_c с уровнем среза 2σ . И решение, уточнение структур проводилось в отсутствие лиганда. Потом на финальном этапе была обнаружена область электронной плотности, в которую была вписана модель лиганда. Поэтому кристаллографический баяс от модели там не присутствовал.

Олейников В.А.:

Отзывы на автореферат, да, два поступило отзыва. Оба положительные. Первый подписан Тихонова Тамара Викторовна, кандидат химических наук. Это лаборатория инженерной энзимологии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, институт биохимии Баха. И второй отзыв на диссертацию содержит даже некое замечание, зачитываю: в качестве недочетов можно отметить встречающиеся в тексте опечатки, неудачные выражения, не относящиеся к научной сути работы, а также отсутствие расшифровки некоторых аббревиатур. Но сделанные замечания не снижают ценности и соответственно соответствует требованиям диссертации, автор несомненно заслуживает, подписано кандидат физ.-мат. наук, по специальности физика кристаллов, начальник отдела, Самыгина Валерия Ролановна. Ну, я думаю, что это просто.

Мирошников А.И.:

Ну да, здесь отвечать нечего. Елена Андреевна Морозова, пожалуйста.

Морозова Е.А., оппонент:

(Излагает положительный отзыв). Добрый день, уважаемые коллеги. Большое спасибо за приглашение. Мой отзыв на диссертацию Петренко Дмитрия Евгеньевича, изучение бактериальной ОрВ с применением рентгеновских методов. Хочу отметить, что создание эффективных лекарственных средств и вакцин против болезни паразитарной природы невозможно без понимания патогенеза этих болезней и механизма взаимодействия паразит-хозяин.

Таким образом, изучение пептидаз бактерий и паразитических простейших, ответственных за деградацию регуляторных пептидов организма-хозяина в физиологических условиях, дает ключ к разгадке механизмов вирулентности, который может быть использован для предотвращения развития этих бактерий. Так как олигопептидаза обнаружена только в геномах бактерий и простейших, ее использование в качестве мишени для создания эффективных ингибиторов представляет интерес современной науки. Однако, как уже было отмечено, создание таких ингибиторов осложняется отсутствием необходимых структурных данных об этих ферментах.

Ранее такие пространственные структуры были получены для фермента только из простейших. Поэтому работа Дмитрия Евгеньевича является актуальной. В его работе получено и депонировано 8 пространственных структур, которые вносят вклад в понимание механизма действия таких ферментов.

Позвольте мне не останавливаться подробно и не повторяться по разделам актуальности, новизны и значимости диссертации. Вместе с тем при общей положительной оценке работы у меня имеются некоторые замечания к диссертанту, такие как замечания по оформлению диссертационной работы, например, в главе «Обзор литературы» содержится подзаголовок, которые не отображены в оглавлении, глава «Материалы и методы» не разделена на отдельные пункты. В связи с этим сложно целиком сразу оценить выбор методов, использованных в работе. Присутствуют недочеты в оформлении текста, нет единообразия в оформлении сокращений, используются преимущественно английские, но есть и русские сокращения. Буквы русского и латинского алфавитов имеют одинаковое начертание, так что отсутствие единообразия существенно усложняет чтение материала. В том числе, каталитические аминокислотные остатки сокращены до однобуквенного обозначения, например, каталитический N или H. Правильно было бы написать название аминокислоты целиком, чтобы не приходилось догадываться, гистидин это, водород или русская буква H, или что-нибудь еще. Также использована разная логика сокращений для олигопептидаз из разных организмов. В некоторых частях текста отсутствует согласование падежей, кое-где встречается калька перевода с английского.

Также у меня имеются замечания по выполненной работе. Например, в пункте 3.1.2 на странице 64 написано «Положение максимумов кривых плавления мутантной формы фермента и дикого типа отличается незначительно, на 2 градуса Цельсия». Однако, как описано в пункте выше, именно такая разница – 2 градуса Цельсия позволяет стабилизировать белки в растворе и получать кристаллы. Поэтому я считаю такую разницу в два градуса достаточно значимой в данных случаях. В этом же пункте предложение: «при этом такие характеристики субстратной специфичности олигопептидазы, как повышенная активность по отношению к двухосновным субстратам или предпочтение остатка аргинина перед лизином в положении P2 сохраняется». Эта фраза построена несколько неудачно, и непонятно, какие кинетические параметры сравниваются. Также в таблице, где приведены эти самые кинетические параметры, наблюдаются ошибки в названии субстратов и, к сожалению, в диссертации не приведены формулы субстратов, что усложняет также понимание данной работы.

На странице 81 в подписи к рисунку 24 не содержится значение уровня срезки электронной плотности. Также данные для структуры, депонированной в PDBbank 7NE7, вызывают сомнения в интерпретации связывания метиленовой группы ингибитора тозиллизилхрометилкетона с водородом боковой группы остатка серина 532, рисунок 24B, левая структура. Если диссертант уверен в интерпретации электронной плотности, пожалуйста, поясните гипотетические механизмы образования такой структуры. Однако перечисленные выше замечания ничуть не умаляют актуальность, новизну и научную значимость в представлении диссертационной работы. Поэтому на основании вышеизложенного следует сделать заключение, что диссертационная работа Петренко Дмитрия Евгеньевича соответствует критериям ВАК, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения

искомой степени кандидата биологической наук по специальности молекулярная биология. Спасибо за внимание.

Мирошников А.И.:

То есть, принципиальных возражений нет?

Морозова Е.А.:

Принципиальных нет.

Мирошников А.И.:

Елена Андреевна, из какой вы лабораторий?

Морозова Е.А.:

Лабораторий химических основ биокатализа.

Мирошников А.И.:

Спасибо

Морозова Е.А.:

Пожалуйста.

Мирошников А.И.:

Так, ну, будете отвечать? Дмитрий Евгеньевич?

Петренко Д.Е.:

У меня вопросов много.

Мирошников А.И.:

Вопросы, слава Богу, не принципиальные.

Петренко Д.Е.:

Большое спасибо за значимый аргументированный вывод, заключение. По поводу оформления я полностью согласен. Единственное, могу прокомментировать, почему действительно, OpB из *Trypanosoma brucei* - TbOpB, OpB из *Leishmania major* - LmOpB, а мой фермент PSP называется. Собственно, это название было дано здесь, в ИБХ РАН, еще когда фермент назывался протеаза из *Serratia proteamaculans*, то есть еще не было его отнесения к семействам. И потом исторически сложилось, что это название...

Мирошников А.И.:

ИБХ виноват.

Петренко Д.Е.:

Да. И название исторически перекочевало в более поздние работы. Теперь касательно более веских замечаний по поводу на 2 градуса Цельсия изменения кривых плавления. Да, действительно присутствует некоторая неаккуратность в формулировках, потому что на первом этапе работы проводился поиск условий, которые способствуют кристаллизации фермента, поиск условий, которые повышают термостабильность фермента. И полученные результаты повышения температуры плавления на 2 градуса были успешно использованы и позволили получить кристаллы. Однако, помимо термостабильности, на кристаллизационную способность белка могут влиять много различных факторов. В частности, у модифицированного фермента, возможно, это связано с уменьшением подвижности фермента за счёт большего количества полярных контактов. И, по всей

видимости, при этом понижение температуры плавления белка оказывает меньше влияния на кристаллизационную способность, чем остальные факторы. Но, действительно, говорить, что здесь два градуса – это значимо, а там – незначительно, это несколько неправильно. Я полностью согласен. По поводу эффективности гидролиза, да, формулы субстратов представлены на слайде. Действительно была допущена опечатка в одной букве, в таблице, а эффективность гидролиза оценивалась в виде отношения константы скорости к константе Михаэлиса. Так, далее следующий. Отсутствуют уровни срезки электронной плотности и можно ли пояснить данные. Срезка электронной плотности составляла значение 2σ , и, к сожалению, при повторном рассмотрении электронной плотности были выявлены некоторые неаккуратности в положении ингибитора, и, по всей видимости, действительно, связывание наблюдалось по тому механизму, который был предложен уважаемым оппонентом. Хочу отметить, несмотря на это, факт нетипичного связывания всё равно сохраняется, поскольку под словом нетипичное связывание воспринимался случай, в котором одна молекула фермента связывает две молекулы ингибитора, что не характерно для других серийных пептидаз. Ну, собственно все.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Следующий оппонент - Лунин Владимир Глебович, пожалуйста.

Лунин В.Г., оппонент:

(Излагает положительный отзыв). Уважаемый председатель, уважаемые члены комиссии, позвольте вам зачитать отзыв на диссертацию Петренко Дмитрия Евгеньевича. Диссертационная работа его посвящена изучению взаимосвязи структур и функций белков. В общем, это является одной из фундаментальных задач энзимологии и структурной биологии.

Детальный анализ пространственной структуры в настоящее время превратился из такого чисто теоретического занятия в необычайно важное практическое занятие, поскольку позволяет понять биокатализ, понять активный центр, подобрать, соответственно, необходимые ингибиторы. Вот на основании этих ингибиторов сделать уже лекарственные средства. Объект, которым занимался соискатель в этом плане необычайно актуальный, потому что он относится к группе рода *Serratia*. Вот этот род входит в десятку основных патогенов внутрибольничных инфекций. И как показывает будущее развитие нашей медицины, внутрибольничные инфекции скоро станут основными инфекциями и самыми опасными для человека. Ну, как представитель института Гамалеи, могу сказать, что в этом направлении как раз сейчас ведутся основные работы в институте, как раз подбирается ингибитор, микроорганизм как раз из группы ВБИ, и поэтому, очевидно, работа, которую сделал Дмитрий Евгеньевич, необычайно актуальна и значима.

Сделано на высоком методическом уровне. Было продемонстрировано использование кристаллографических методов, методов геномной инженерии, малоуглового рассеяния, и всё в совокупности это позволяет сказать, что автор использовал большой арсенал средств для изучения своего объекта.

Диссертация построена по традиционному плану. И, в принципе, мне понравился хороший большой литобзор, в котором был исследован объект. Привлечено 194 источника, что показывает, что соискатель добросовестно изучил литературу по этой теме.

Результаты состоят из двух разделов и содержат, собственно говоря, данные кристаллографического анализа, а также изучение физико-химических свойств, каталитической активности как нативного, так мутантных ферментов.

Следующий основной, меня очень порадовал, биоинформатический раздел, где исследован способ стабилизации каталитической триады протозойных ферментов, и в котором показано, что это способ консервативен для всех представителей группы, но бактериальные ферменты, которые как озвучил автор, разделяются на две группы. И в заключение автором были построены модели олигопептидаз из бактерий, как раз возбудителей внутрибольничных

инфекций, что показывает, что автор не оторван, находится не только в реалиях науки, но и нацелен на решение практических задач и разработке эффективных ингибиторов для протеаз из *Serratia proteamaculans*.

Результаты работы, изложены подробно и читаются с большим интересом. Видно, что был проделан большой объем работы, выполнен на высоком научном уровне, и полученные результаты имеют практическое значение и могут использоваться в дальнейшем исследовании, это как бы хотелось особо подчеркнуть. В общем, как говорил предыдущий оппонент, работа, несмотря на то, что сделана на высоком научном уровне, имеет опечатки, неудачные выражения, англицизмы. Ну и из тех вопросов, которые я бы хотел задать диссертанту: что в работе обсуждается способ стабилизации каталитической структуры в активной конформации у протозойных и бактериальных ферментов. Что можно сказать о модели взаимодействия олигопептидазы с субстратами, которую получил соискатель, это конформационный отбор или индуцированная подгонка? Во всём остальном могу сказать, что высказанные замечания не затрагивают полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертации.

На основании этого можно сделать заключение, что дистанционная работа Петренко Дмитрия Евгеньевича соответствует критериям, установленным положением о присуждении учёных степеней, а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Спасибо за внимание.

Мирошников А.И.:

Спасибо, Владимир Глебович.

Петренко Д.Е.:

Спасибо большое. По поводу, какой механизм присутствует, механизм конформационного отбора или индуцированной подгонки, на самом деле единого мнения до сих пор нет. В литературе существует много различных доводов, при этом ранее в пользу индуцированной подгонки основным свидетельством было то, что кристаллические структуры для свободных ферментов были получены все в открытой конформации, а все закрытые конформации ферментов были получены в присутствии ковалентных ингибиторов. Что как раз свидетельствует, что именно присутствие субстрата в активном центре вызывает переход к закрытой конформации.

Однако в последнее время были получены несколько пространственных структур пролилолигопептидаз, похожих ферментов, в закрытой конформации без субстратов. Кроме того, за конформационную подборку свидетельствует, во-первых, повышенная лабильность фермента. Кроме того, для ОрВ были обнаружены ферменты в промежуточной конформации, в кристаллических структурах которых, конечно, присутствовали молекулы спермина, но они находились в удалении от активного центра и субстрат-связывающего кармана. Кроме того, методами малоуглового рассеяния было показано, что даже в отсутствие спермина присутствует в растворе фракция ферментов не только в открытой конформации. Кроме того, об этом же, о движении доменов без какого-то внешнего воздействия, могут свидетельствовать данные молекулярно-динамических симуляций, которые проводились в большом количестве, но практически не были включены в диссертацию.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Следующий пункт - у нас дискуссия. Желаящие выступить? Да, пожалуйста. Давайте.

Михайлова А.Г.:

Ну здесь уже прозвучало, что объект, собственно, наш.

Эта протеаза была обнаружена в лаборатории химии ферментов нашего института. И поэтому, поскольку достаточно долго мы не знали, с чем имеем дело, она так и получила такое название. Но я хочу подчеркнуть, что вообще бактериальных олигопептидаз В никогда и никому не удавалось закристаллизовать. Мало того, были такие сведения, что кому-то удалось закристаллизовать, они даже радостно это опубликовали, но не смогли расшифровать структуру.

И мне кажется, что это не случайное совпадение, потому что мы тоже достаточно долго с Татьяной Ракитиной пытались закристаллизовать этот фермент, и очень долго это не получалось. И, наверное, это не случайное совпадение, что пошли у нас первые структуры именно с приходом в группу Димы Петренко. Это очень приятно, это очень хорошо, и это, опять же, повторяю, это, в общем-то, большое достижение. Ну кроме того, я, конечно, еще хочу сказать о его руководителе, потому что Татьяна Владимировна, она сдвинула эту гору, и вот заиграла наша тематика. Без нее, конечно, никакие кристаллические структуры не были бы возможны и не получили бы такого развития. Еще хочу подчеркнуть, потому что прозвучал, значит, момент о внутрибольничных инфекциях.

Но это продолжение работы, тут не прозвучало, поскольку Дима этим не занимается. Но уникальная особенность олигопептидаз В – это способность гидролизовать связь аргинин-пролил. Это то, чего не умеют практически все ферменты. Но это и неспроста, поскольку мы сейчас развиваем такую мысль, что физиологическая роль бактериальных олигопептидаз В – это гидролиз – пролин-богатых антимикробных пептидов патогенов.

Сами понимаете, какая-то актуальная связь. У нас сейчас будет публиковаться работа, она уже, собственно, написана об этом. Так что очень интересная есть перспектива у этой работы. И, естественно, поскольку будут требоваться ингибиторы олигопептидаз В, то трехмерные структуры – это необходимая вещь. Еще раз хочу сказать, что работа получилась, с моей точки зрения, хорошая. Спасибо за внимание.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Дмитрий Евгеньевич, ну давайте, благодарите, да будем голосовать.

Петренко Д.Е.:

Спасибо. Хотелось бы выразить благодарность, во-первых, членам диссертационного совета за предоставленную возможность выступить. Также особая отдельная благодарность Татьяне Владимировне Ракитиной за, по сути, за всё, за научное руководство, ценные советы, поддержку. Также огромная благодарность за инициацию структурных исследований и помощь в энзимологических исследованиях Михайловой Анни Григорьевне, а также за получение кристаллов исследованных белков Николаевой Алёне Юрьевне, Дороватовскому Павлу Владимировичу и Бойко Константину Михайловичу за сбор дифракционных данных, Владимиру Игоревичу Тимофееву за помощь в обработке и анализе дифракционных данных, Попову Антону Михайловичу за проведение МУРР-эксперимента, Бритикову Владимиру Владимировичу за помощь в расшифровке данных малоуглового рассеяния, Курановой Инне Петровне за помощь в структурном анализе, Клейменову Сергею Юрьевичу за проведение эксперимента дифференциальной сканирующей калориметрии и Арапиди Георгию Павловичу и Гордеевой Веронике Дмитриевне за помощь в обработке данных биоинформатического анализа. Также глубокую признательность хочу выразить моим коллегам по лаборатории Агаповой Юлии Константиновне и Власкиной Анне Валентиновне за неоценимую помощь на разных этапах выполнения работы. Спасибо.

Мирошников А.И.:

Спасибо. Так коллеги, ну что, голосуем? Давайте проголосуем.

(Идет тайное голосование)

Олейников В.А.:

Так, счетная комиссия закончила свою работу, и я объявляю результаты голосования. Петренко Дмитрий Евгеньевич, присутствовало на заседании 20 членов диссертационного совета, роздано бюллетеней - 20, оказалось в урне - 20, «за» - 20, «против», недействительных нет.

Мирошников А.И.:

Так, голосуем за утверждение результатов голосования. *(Принято единогласно).*

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

(Замечаний нет. Диссертационный совет единогласно принимает заключение)

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

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

