

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН),
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук
аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 13 марта 2024 г. № 6

О присуждении **Петренко Дмитрию Евгеньевичу**, РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Изучение бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* с применением рентгеновских методов» по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология принята к защите 06.12.23 г. (протокол заседания №30) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), (адрес: ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997), действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Петренко Дмитрий Евгеньевич, 09 мая 1993 года рождения. В 2017 году соискатель окончил магистратуру факультета нано-, био-, информационных и когнитивных технологий Московского физико-технического института, в 2021 окончил аспирантуру федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Диссертация выполнена в лаборатории «Геномная фабрика» Центра геномных исследований «Курчатовский геномный центр» Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Научный руководитель - кандидат химических наук Ракитина Татьяна Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории белков гормональной регуляции ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Лунин Владимир Глебович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биологически активных наноструктур, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва), и Морозова Елена Андреевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук (Москва) дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» в своем положительном отзыве, составленном кандидатом физико-математических наук Борщевским Валентином Ивановичем, заведующим лабораторией структуры и динамики биомолекул и кандидатом физико-математических наук Ремеевой Алиной Анваровной, старшим научным сотрудником лаборатории структурного анализа и инжиниринга мембранных систем и подписанном к.ф.-м.н. Баганом Виталием Анатольевичем, проректором по научной работе, указала, что диссертационная работа Петренко Дмитрия Евгеньевича соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 15 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 8 работ общим объемом 6 печатных листов, опубликованных в рецензируемых научных изданиях. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем научной степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Д.Е. Петренко внес основной или существенный вклад:

1. **Petrenko, D.E.**; Karlinsky, D.M.; Gordeeva, V.D.; Arapidi, G.P.; Britikova, E.V.; Britikov, V.V.; Nikolaeva, A.Y.; Boyko, K.M.; Timofeev, V.I.; Kuranova, I.P.; Mikhailova, A.G.; Bocharov, E.V.; Rakitina, T.V. Crystal Structure of Inhibitor-Bound Bacterial Oligopeptidase B in the Closed State: Similarity and Difference between Protozoan and Bacterial Enzymes // Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 2286.
2. **Petrenko, D.E.**; Timofeev, V.I.; Britikov, V.V.; Britikova, E.V.; Kleymenov, S.Y.; Vlaskina, A.V.; Kuranova, I.P.; Mikhailova, A.G.; Rakitina, T.V. First Crystal Structure of Bacterial Oligopeptidase B in an Intermediate State: The Roles of the Hinge Region Modification and Spermine.// Biology 2021, 10, 1021
3. **Петренко Д.Е.**, Николаева А.Ю., Лазаренко В.А., Дороватовский П.В., Тимофеев В.И., Власкина А.В., Корженевский Д.А., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Поиск условий, способствующих кристаллизации олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans*, методом дифференциальной сканирующей флуориметрии // Кристаллография, 2020, 65(2), 266-270
4. **Петренко Д.Е.**, Николаева А.Ю., Лазаренко В.А., Дороватовский П.В., Тимофеев В.И., Власкина А.В., Корженевский Д.А., Михайлова А.Г., Бойко К.М., Ракитина Т.В. Кристаллографические исследования мутантных форм и комплексов олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans*// Кристаллография, 2020, 65(6), 907-913
5. Timofeev, V.I.; **Petrenko, D.E.**; Agapova, Y.K.; Vlaskina, A.V.; Karlinsky, D.M.; Mikhailova, A.G.; Kuranova, I.P.; Rakitina, T.V. The Crystal Structure of α -p-tosyl-lysyl

Chloromethylketone-Bound Oligopeptidase B from *Serratia Proteamaculans* Revealed a New Type of Inhibitor Binding // *Crystals* 2021, 11, 1438.

6. **Петренко Д.Е.**, Тимофеев В.И., Карлинский Д.М., Плащинская Д.Д., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Изучение свободной энергии связывания пептидных субстратов в активном центре олигопептидазы B из *Serratia proteamaculans* методом ММ-GBSA // *Кристаллография*, 2022, 67(3), 411-418
7. **Petrenko D.E.**, Mikhailova A.G., Timofeev V.I.; Agapova Yu. K., Karlinsky D.M., Komolov, A.S., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A.V., Rumsh, L.D., Rakitina T.V. Molecular dynamics complemented by site-directed mutagenesis reveals significant difference between the interdomain salt bridge networks stabilizing oligopeptidases B from bacteria and protozoa in their active conformations // *J. Biomol. Struct. Dyn*, 2020, 38(16), 4868-4882
8. Britikov, V.V.; Timofeev, V.I.; **Petrenko, D.E.**; Britikova, E.V.; Nikolaeva, A.Y.; Vlaskina, A.V.; Boyko, K.M.; Mikhailova, A.G.; Rakitina, T.V. Elucidation of the Conformational Transition of Oligopeptidase B by an Integrative Approach Based on the Combination of X-ray, SAXS, and Essential Dynamics Sampling Simulation // *Crystals* 2022, 12, 712.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. Лунина Владимира Глебовича. Отзыв положительный, принципиальных замечаний не содержит. Оппонент отмечает что в тексте встречаются неизбежные при таком объеме текста опечатки и неудачные выражения, в небольшом объеме присутствуют англицизмы. Имеется также уточняющий вопрос к диссертанту. В работе обсуждается способ стабилизации каталитической триады в активной конформации у протозойных и бактериальных ферментов. А что можно сказать о модели взаимодействия OpB с субстратами: это конформационный отбор или индуцированная подгонка?

Отзыв официального оппонента к.х.н. Морозовой Елены Андреевны. Отзыв положительный, содержит следующие вопросы и замечания.

Структура диссертации:

- а) Пункты 1.3.1, 1.4.1 главы «Обзор литературы» содержат подзаголовки, которые не отображены в оглавлении.
- б) Глава «Материалы и методы» не разделена на отдельные пункты, в связи с этим сложно целиком сразу оценить выбор методов, использованных в работе.
- в) Первый абзац пункта 3.1.8. полностью посвящён описанию и применению метода МУРР и должен быть перенесён из главы «Результаты и обсуждения» в главу «Материалы и методы».

Недочёты оформления текста: - в работе присутствуют опечатки, отсутствует единообразие в оформлении сокращений, присутствуют несогласованность падежей и «калька» с английского языка.

На странице 16 перепутана ссылка: «Кинетические исследования этого фермента показали, что лимитирующей стадией катализа являются конформационные изменения, а не химическая стадия, что характерно для классических сериновых протеаз трипсинового типа [17]». Полагаю, имеется в виду ссылка 14.

Замечания по выполненной работе.

- 1) В пункте 3.1.2 (страница 64) написано: «положения максимумов кривых плавления (T_{max}) PSPmod и PSP отличаются НЕЗНАЧИТЕЛЬНО (на 2 °C)» – однако, как описано в п. 3.1.1., именно такая разница (2 °C) позволила вам стабилизировать белки в растворе и получить кристаллы.
- 2) В пункте 3.1.2 (страница 64): «При этом такие характеристики субстратной специфичности PSP, как повышенная активность по отношению к двухосновным субстратам или предпочтение остатка Arg перед Lys в положении P2, сохраняются.» - несколько неудачно составлено предложение. Не понятно, какие кинетические параметры сравниваются. В таблице 9 ошибка в название субстрата (написано Z-KP-pNA, скорее всего имеется ввиду Z-KR-pNA). Формулы субстратов, к сожалению, в диссертации не представлены.
- 3) Страница 81. Подпись к рисунку 24 (б, в) не содержит значений уровня срезки электронной плотности (map level). Данные для структуры 7NE7, депонированные в PDB Bank, вызывают сомнение в интерпретации связывания метиленовой группы ТСК с кислородом боковой группы серина 532 (рисунок 24В, левая структура). С химической точки зрения представляется возможным образование двух первых структур, но механизм образования третьей вызывает вопрос. Если диссертант уверен в интерпретации электронной плотности, пожалуйста, поясните гипотетический механизм образования такой структуры.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. В докладе не были представлены характеристики полученных дифракционных данных, а также значения основных параметров, характеризующих качество проведенной автором обработки дифракционных данных.
2. При описании экспериментов по снятию дифракционных данных не были указаны конкретные названия и характеристики используемых экспериментальных установок.
3. Диссертантом не было раскрыто, как проводился выбор стабилизирующих агентов, какова возможная природа стабилизации PSP спермином.
4. Не было обсуждено, какой возможный функциональный смысл имеет промежуточная конформация PSP.
5. На рисунках, демонстрирующих электронную плотность лиганда, не разъяснено, на каком уровне и какого типа карты представлены вокруг лиганда, содержит ли плотность кристаллографический баяс от модели.

Отзыв на автореферат к.х.н. Тихоновой Тамары Викторовны, старшего научного сотрудника лаборатории инженерной энзимологии ФИЦ «Фундаментальные Основы

Биотехнологии» РАН. Институт биохимии имени А.Н. Баха. Отзыв положительный. Замечаний нет.

Отзыв на автореферат к.ф.-м.н. Самыгиной Валерии Ролановны, руководителя отдела структурной биологии НИЦ «Курчатовский институт». Отзыв положительный, содержит следующие замечания: встречающиеся в тексте опечатки и неудачные выражения, не относящиеся к научной сути работы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы: структурная биология, энзимология, микробиология, генная инженерия, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих научных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы, а также высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены и функционально охарактеризованы ранее неизученные мутантные варианты PSP: PSPmod, в которой область первого шарнирного пептида заменена на сайт расщепления протеазой вируса гравировки табака (TEV), и её производные PSPmod-S532A, PSPmod-F75E и PSPmod-E125A, а также каталитически неактивный мутант PSP-S532A. Установлено, что модификация шарнирного региона значительно снижает каталитическую эффективность фермента. Проведен подбор условий, способствующих кристаллизации белка, позволивший впервые вырастить кристаллы PSP, пригодные для PCA. Получены комплексы PSP и PSPmod с ковалентным ингибитором Na-p-тозил-лизилхлорметилкетонам (ТСК) и установлено, что модификация шарнирного региона влияет на способ связывания белка и ингибитора, при этом обнаружен ранее неизвестный тип связывания. Впервые получены, депонированы в базу данных PDB и охарактеризованы кристаллические структуры бактериальных OpB и их комплексов с ковалентно-связанным ингибитором ТСК в двух разных конформациях: семь структур представляют промежуточную конформацию фермента, ранее не описанную у OpB, а одна структура представляет фермент в закрытой (каталитически-активной) конформации. Впервые проведено изучение конформации OpB в растворе. Методом МУРР установлено, что в растворе PSP и PSPmod существуют преимущественно в открытой конформации, а при добавлении спермина фермент стабилизируется в промежуточной конформации. В случае PSPmod в растворе детектируется небольшая фракция промежуточной конформации. Впервые установлено, что в PSP и TьOpB стабилизация собранной каталитической триады осуществляется разными способами. Проведенный биоинформатический анализ показал, что по способу стабилизации

собранный каталитической триады (PSP- и TbOpB-подобному) все бактериальные OpB можно разделить на две основные группы.

Теоретическое значение исследования подтверждается тем, что полученные пространственные структуры OpB бактерий в двух разных конформациях расширяют представление о конформационном разнообразии OpB. Анализ структуры PSP в закрытой конформации позволил выявить новый механизм стабилизации каталитической триады фермента в активном состоянии. Полученные данные о влиянии модификации шарнирного региона PSP на каталитическую активность фермента расширяют представления о возможных направлениях поиска высокоспецифичных ингибиторов. Подобрана и успешно опробована новая эффективная комбинация экспериментальных и вычислительных методов структурной биологии, основанная на использовании структурных данных низкого разрешения, полученных в МУРР экспериментах, как для уточнения конформации белка в растворе, так и для валидации структурных моделей, полученных методами молекулярного моделирования и молекулярной динамики (МД).

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что полученные пространственные структуры могут служить отправными точками для моделирования каталитического цикла бактериальных OpB, получения мутантных белков с изменённой активностью и/или поиска специфических ингибиторов фермента, которые могут быть использованы для создания новых антибактериальных препаратов.

Показана функциональная значимость шарнирного региона фермента, который может служить мишенью для поиска и/или моделирования ингибиторов OpB и POP (предположительно пептидной природы), способных оказывать терапевтический эффект при протозойных и бактериальных инфекциях.

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

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и постановке экспериментов, разработке методик, а также в обработке и анализе результатов. Автором были получены молекулярные модели целевого фермента и изучено их поведение методом молекулярно-динамической симуляции. Были выявлены функционально-важные заряженные аминокислотные остатки интерфейса между доменами, проведён мутагенез, получены и охарактеризованы мутантные ферменты. Были подготовлены образцы рекомбинантных белков для рентгеноструктурного анализа. Автором были найдены условия, способствующие кристаллизации целевого фермента.

Соискателем были обработаны дифракционные данные, собранные с полученных кристаллов в рентгеноструктурном эксперименте, решены и уточнены пространственные структуры. Энзимологические исследования проводились совместно с А.Г. Михайловой (ИБХ РАН). Кристаллизация белка проводилась Николаевой А.Ю. (НИЦ КИ). Сбор дифракционных данных был проведен Дороватовским П.В. (НИЦ КИ) и Бойко К.М. (ИНБИ РАН). Данные эксперимента МУРР были получены Поповым А.М. (ESRF), расшифровка данных проводилась совместно с Бритиковым В.В. (ИБОХ НАН). Данные ДСК были получены Клейменовым С.Ю. (ИНБИ РАН). Обработка данных биоинформатического анализа проводилась при поддержке Арапиди Г.П. и Гордеевой В.Д. (ФНКЦ ФХМ).

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет постановил, что диссертация Петренко Дмитрия Евгеньевича является законченной научно-квалификационной работой. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Петренко Д.Е. «Изучение бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* с применением рентгеновских методов» полностью соответствует всем критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 №1690; 26.01.2023 г. №101.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1. Насколько пространственная структура фермента в кристалле соответствует реальной структуре фермента в клетке?
2. Каким образом проводился анализ конформации фермента в растворе методом МУРР. Была ли получена пространственная структура?

Соискатель Петренко Д.Е. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию

1. Для ответа на этот вопрос помимо рентгеноструктурного анализа кристаллов белка был проведен эксперимент малоуглового рентгеновского рассеяния, в котором изучались растворы белка. Было показано, что в растворе также присутствуют ферменты в конформации, отличной от полученных кристаллических структур.
2. Методом МУРР были получены экспериментальные кривые рассеяния для растворов белков и проведено их сравнение с теоретическими кривыми, рассчитанными для пространственных структур в закрытой и промежуточной конформации, а также гомологичной модели открытой конформации. Получение пространственных структур PSP методом МУРР не производилось.

На заседании 13 марта 2024 г. диссертационный совет постановил за решение задачи по изучению структурных особенностей бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans*, имеющей важное теоретическое и практическое значение для развития соответствующих областей молекулярной биологии, присудить Петренко Дмитрию Евгеньевичу ученую степень кандидата биологических наук.

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

Председатель
диссертационного совета
академик РАН



Мирошников Анатолий Иванович

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

Олейников Владимир Александрович

13.03.2024 г.