

**ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора биологических наук, профессора кафедры биофизики биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» *Максимова Георгия Владимировича* на диссертационную работу *Суковатого Льва Алексеевича* «Молекулярно-динамический анализ влияния осмолитов на структуру бактериальных люцифераз», представленную на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности: 1.5.2. -Биофизика.

Актуальность избранной темы исследования

Диссертационная работа Л. А. Суковатого посвящена исследованию молекулярных механизмов воздействия осмолитов на активность бактериальной люциферазы, что важно не только для понимания механизма ферментативного катализа, но и для формирования эффективных биотехнологий и методов диагностики в биомедицине. Перераспределение осмолитов выявлено при стрессовых условиях (температура, осмолярность, давление), так как эти молекулы регулируют объем и биоэнергетику клетки. Одной из особенностей действия осмолитов относят формирование термодинамической стабильности биомолекул, регуляция фолдинга и агрегации белков. Однако, механизм стабилизации молекулы белка осмолитами и контроля активности ферментов изучены явно недостаточно, что и послужило формированию цели и задач диссертационной работы Л. А. Суковатого. В связи с чем было проведено исследование стабильных и высокоактивных ферментов-люцифераз. В настоящее время хорошо изучены основные стадии ферментативной реакции и доказано, что скорости реакции зависит от типа и специфического действия осмолита, на динамические свойства молекулы люциферазы. Важно, что моделирование динамики белка с помощью молекулярной динамики дает возможность оценить влияние молекул белка, воды и осмолита на структурные и динамические свойства фермента.

Цель диссертационной работы Л. А. Суковатого заключалась в исследовании с помощью методов молекулярной динамики, структурно-динамических механизмов действия осмолитов на функциональные свойства бактериальной люциферазы. Для достижения цели автором были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать изменения структурно-динамических характеристик бактериальной люциферазы (компактность, подвижность основной цепи, стабильность укладки, площадь поверхности) в присутствии осмолитов.

2. Выявить эффекты действия осмолитов на молекулярные свойства функционально важных сайтов люциферазы (активный центр, мобильная петля, индивидуальные аминокислотные остатки).

3. Проанализировать влияние осмолитов на состав гидратного слоя бактериальной люциферазы и на энергию взаимодействия между компонентами моделируемой системы.

4. Выявить корреляции между изменениями структурно-динамических характеристик люциферазы специфическим действием осмолитов на функциональные свойства фермента.

5. Провести сравнительный анализ эффектов действия осмолитов на бактериальные люциферазы двух подсемейств (*Photobacterium leiognathi* и *Vibrio harveyi*) для выявления универсальных и специфических механизмов воздействия полиолов и сахаров.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертация Л. А. Суковатого изложена на 141 страницах, содержит 52 рисунков и 14 таблиц. Диссертация оформлена в традиционном стиле и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы и список литературы. Список литературы содержит 173 источников. В целом оформление диссертации соответствует требованиям, изложенным в ГОСТ Р 7.0.11.

Во введении представлено обоснование актуальности цели исследования. Дается описание роль осмолитов в клетке, их эффекты на уровне структурно-функциональные характеристики белков, а также подходы моделирования ферментов с помощью молекулярной динамики (МД). Часть обзора литературы посвящена структурно-функциональным особенностям двух бактериальных люцифераз - *Vibrio harveyi* и *Photobacterium leiognathi*. Анализ публикаций, проведенный автором, свидетельствует, что возможны вариации взаимодействий в системе «фермент-субстрат-осмолит» данного фермента и характера влияния осмолитов. Цель и задачи работы сформулированы четко.

Глава 1 содержит обзор литературы, в котором анализируются данные по современному состоянию проблемы. Отмечается, что возможны разные виды взаимодействий в системе фермент-субстрат-осмолит, и характер влияния осмолитов связан с разнообразием механизмов воздействия на фермент: низкомолекулярные соединения четко взаимодействуют с определенными сайтами молекулы белка, меняя

ориентации боковых цепей аминокислотных остатков. Отмечу, что автор приходит к важному заключению: «действие молекул осмолитов может менять взаимодействие молекул воды за счет перераспределения водородных связей в аполярном слое фермента, меняя его ферментативную активность». Из обзора литературы следует, что современные методы теоретического моделирования позволяют исследовать воздействие осмолитов на структуру и функцию белков. Используя информацию о кристаллической структуре белка и метод направленного мутагенеза, с помощью молекулярной динамики, ранее были охарактеризованы изменения структурны фермента при функционировании бактериальной люциферазы. В основе обзора литературы лежат существенные публикации последних лет. Обзор логично построен, дает общее представление об изучаемой проблеме, а также свидетельствует о способности автора анализировать, систематизировать и интерпретировать информацию, представленную в научных статьях.

Глава 2. Глава включает в себя описание методов и подходов, использованных в диссертационной работе. В тексте подробно изложены принципы и методики измерений, дизайн экспериментов и алгоритмы анализа данных. В исследовании использовали структуру бактериальной люциферазы *V. harveyi* из банка данных (PDB ID: 3FGC), а участок мобильной петли α -субъединицы (283–290 а.о.) и С-конец β -субъединицы (319–324 а.о.) моделировали с помощью программного пакета MODELLER. Полученную структуру использовали в качестве шаблона для реконструкции с помощью веб-сервиса SWISS-MODEL. Молекулярное моделирование структур фермента было проведено с помощью пакета GROMACS 2020.04. Для описания межатомных взаимодействий использовали силовое поле CHARMM36. Обработку молекулярно-динамических траекторий проводили с помощью плагинов GROMACS. Полость активного центра люцифераз охарактеризовали с помощью веб-сервиса CASTp, а объём активного центра фермента и его доступность для молекул осмолитов - с помощью плагина trj_cavity 2.0. Визуализация результатов проведена в UCSF Chimera 1.15. Выбор методов и методик исследования, на мой взгляд, является оптимальным для решения поставленных задач.

В главе 3 подробно изложены результаты проведённых исследований, каждый раздел завершается смысловым рассуждением. В ходе исследования был проведён расчет МД структуры фермента в матрице молекул воды и смесей молекул воды и осмолитов. Были проведены расчёты энергетической минимизации и релаксации, а также было

моделирование МД субстратов ферментативной реакции бактерий. Автором проведен анализ молекулярных механизмов влияния осмолитов класса полиолов и сахаров на структурно-динамические характеристики крупных димерных белков на примере двух бактериальных люцифераз. Успешно проведена реконструкция трехмерной структуры бактериальной люциферазы *P. leiognathi* («быстрой» люциферазы), исследованы её структурно-динамические свойства и выполнено сравнение с характеристиками известной кристаллической структуры люциферазы *V. harveyi* («медленной» люциферазы). Автором выявлены корреляции между значениями каталитической константы фермента – бактериальной люциферазы *P. leiognathi* – в средах с осмолитами и энергией взаимодействий в системе белок-вода-осмолит.

В главе 4 автор излагает полученные результаты, проводит аналогии и сравнения с результатами из литературных источников, полученными другими исследователями. В заключении автор суммирует основные этапы работы и полученные результаты, подвергая их смысловому анализу. Выводы объективно отражают полученные автором данные и полностью соответствуют поставленным цели и задачам исследования.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Автором объективно сформулированы научные положения и выводы. Для этого применены научно-обоснованные теории, систематизированные опубликованные научные данные и внутренне непротиворечивые результаты собственных оригинальных исследований. Автором проведен анализ молекулярных механизмов влияния осмолитов класса полиолов и сахаров на структурно-динамические характеристики крупных димерных белков на примере двух бактериальных люцифераз. Успешно проведена реконструкция трехмерной структуры бактериальной люциферазы *P. leiognathi* («быстрой» люциферазы), исследованы её структурно-динамические свойства и выполнено сравнение с характеристиками известной кристаллической структуры люциферазы *V. harveyi* («медленной» люциферазы). Автором выявлены корреляции между значениями каталитической константы фермента – бактериальной люциферазы *P. leiognathi* – в средах с осмолитами и энергией взаимодействий в системе белок-вода-осмолит.

На мой взгляд, теоретическое значение работы заключается в выявлении взаимосвязи между стабилизацией белков осмолитами и их влиянием на ферментативную функцию белков, что является важной фундаментальной задачей на пути установления особенностей организации метаболизма клеток в условиях выживания под действием неблагоприятных факторов среды. Считаю, что полученные результаты обладают практической ценностью, поскольку могут быть использованы для повышения эффективности использования ряда биоаналитических методов, основанных на биolumинесцентных реакциях в биомедицине и

биотехнологии.

У меня не вызывает сомнений обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Достоверность и новизна научных положений и выводов

Результаты диссертационной работы Л. А. Суковатого подтверждены общепринятыми методами статистического анализа, не противоречат актуальным научным теориям и представлениям относительно тематики работы. Представленные результаты диссертационной работы прошли апробацию и обсуждение на 5 международных и всероссийских конференциях, а также на научных семинарах кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ и лаборатории биолюминесцентных биотехнологий СФУ. В 2021 г. работа была отмечена стипендией Фонда Осаму Шимомура за успешное исследование в области биолюминесценции. Диссертационное исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований в рамках конкурса «Аспиранты» (проект № 20-34- 90118) и Российским фондом фундаментальных исследований совместно с Правительством Красноярского края в рамках региональных конкурсов научных исследований, выполняемых молодыми учеными (проекты № 20-44-243002 и №18- 44-243009).

Также результаты работы прошли рецензирование в международных научных изданиях в процессе публикации статей. По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 8 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в индексируемые базы данных Web of Science (3 статьи Q1), Scopus и в перечень ВАК.

Диссертационная работа Л. А. Суковатого оценивается мною положительно. Однако, при чтении диссертации возникли **уточняющие вопросы и замечания:**

1. В тексте работы встречаются отдельные неточности формулировок, недостатки форматирования и стилистически не оптимальные выражения: «Видно; Это говорит о том; осмопротекторы должны исключаться с поверхности белка с одновременным повышением уровня его гидратации; получено и т.д.
2. Автор утверждает, что «с помощью экспериментальных методов достаточно сложно исследовать конформационную динамику белка и специфику его взаимодействия с разными низкомолекулярными соединениями». Звучит странно при широком использовании методов ИК – и КР- спектроскопии, а также флуоресцентных методов для исследования конформации белка в ходе работы фермента.
3. Почему «не было выявлено концентрационных эффектов глицерина или

сахарозы на компактность глобулы бактериальных люцифераз»?

4. Как можно представить, «что поверхности люцифераз в целом схожи и обладают близкими конформационными и электростатическими характеристиками»

5. Требуется пояснения фраза «получено, что если доступ осмолитов в активный центр фермента зависит от типа люциферазы, то на количество молекул воды в полости прежде всего влияет тип осмолита, а не фермента»?

На основе изучения текста диссертации и опубликованных работ по теме диссертации, я могу заключить, что диссертационная работа Л.А. Суковатого актуальна по теме и является логически завершенным исследованием, выполненным на современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы Л.А. Суковатого получены впервые и опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ и индексируемых базами Web of Science и Scopus. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов сомнений не вызывает. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нём правильно отражены основные результаты и выводы диссертации, новизна и практическая значимость результатов исследования.

Таким образом, диссертация Л. А. Суковатого является научно-квалификационной работой, в которой, с помощью методов молекулярной динамики, исследован механизм действия осмолитов на функциональные свойства бактериальной люциферазы, имеющий важное значение для развития ряда положений молекулярной биофизики, более того в работе изложены новые факты воздействия молекул осмолитов на гидратный слой бактериальной люциферазы и энергию взаимодействия между компонентами системы, имеющие существенное значение для развития страны, что соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Официальный оппонент доктор биологических наук
(03.01.02 - Биофизика), профессор
кафедры биофизики биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова»
«21 » декабря 2023 г.



Г.В. Максимов

Максимов Георгий Владимирович

Почтовый адрес: 119991,

Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1

Федеральное государственное бюджетное образовательное отделение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Телефон: +7 [redacted] 99,

e-mail g [redacted] mail

Подпись д.б.н. Максимова Г.В. заверяю:

Декан биологического факультета МГУ

имени М.В. Ломоносова

академик РАН

[redacted] М.П. Кирпичников

119991, Российская Федерация, Москва,

Ленинские горы, д. 1

Сайт: <https://www.msu.ru/>, Телефон: +7 (495) 939-10-00,

Адрес электронной почты: info@rector.msu.ru

