

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Суковатого Льва Алексеевича «Молекулярно-динамический анализ влияния осмолитов на структуру бактериальных люцифераз» по специальности 1.5.2. Биофизика на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук

Представленная к защите работа Суковатого Льва Алексеевича посвящена исследованиям влияния осмолитов на структуру и динамику бактериальных люцифераз, которые связаны с их ферментативной активностью. Осмолиты представляют собой низкомолекулярные соединения, присутствующие внутри живых клеток и регулирующие их функционирование в стрессовых условиях. Многие осмолиты, называемые осмопротекторами, стабилизируют при этом нативную глобулярную структуру белков, препятствуют их денатурации, агрегации и неправильному сворачиванию. Однако стабилизация структуры – далеко не единственный эффект, наблюдаемый в присутствии осмолитов. Небольшие по размеру молекулы осмолитов способны проникать в активный центр ферментов и другие полости белков, что, безусловно, может сильно повлиять на ферментативную активность. Они также могут нековалентно связываться с поверхностью белка, изменять конформации боковых цепей, взаимодействовать с субстратами ферментов, а в некоторых случаях и оказывать дестабилизирующее влияние на нативную структуру. Понимание закономерностей таких изменений в зависимости от природы и концентрации осмолита и белка возможно лишь на основе изучения механизма взаимодействий между ними на молекулярном уровне. Метод молекулярно-динамического моделирования при грамотном его использовании, безусловно, является чрезвычайно ценным инструментом для подобных исследований, позволяющим получить огромное количество информации, недоступных для экспериментальных методов. В настоящий момент молекулярная динамика переживает бурное развитие, что связано с ростом доступных вычислительных мощностей, появлением большого числа новых методов и алгоритмов, как правило, с открытым исходным кодом, появлением достоверных данных о трехмерной структуре большинства белков и прочих биомакромолекул, повышением компетентности исследователей в области вычислительных методов.

Результаты работы, полученные с использованием данного метода, анализируются автором с использованием современных подходов и алгоритмов для извлечения информации о взаимодействиях белков с растворами осмолитов. На примере осмолитов разной химической природы и молекулярного размера исследованы различные аспекты влияния растворителя на функционирование бактериальных люцифераз через изменение их структуры, включая конформации и динамику как отдельных аминокислотных остатков, так и крупных структурных элементов, таких как мобильная петля и полость активного центра.

В работе получено детальное описание строения и конформационной динамики активного центра "быстрой" люциферазы *Photobacterium leiognathi* в отсутствии и присутствии осмолитов, что позволит в дальнейшем изучать структурные основы кинетических различий ферментов данного семейства. На примере бактериальных люцифераз получено свидетельство смены механизма взаимодействия белков с водой

с ростом концентрации осмолита, а именно – преимущественное взаимодействие с осмолитом сменяется преимущественной гидратацией. Подробно исследовано проникновение различных осмолитов в активные центры ферментов, их влияние на подвижность мобильной петли, участвующей в стабилизации интермедиатов катализируемой реакции. Также исследованы невалентные взаимодействия некоторых осмолитов (глицерина и сахарозы) с фосфатными группами субстратов люцифераз FMN и NADH.

Диссертационная работа Суковатого Л.А. изложена на 141 странице, содержит 52 рисунка и 14 таблиц, состоит из введения, 4 глав, заключения и списка цитируемой литературы из 173 источников.

Во **введении** обоснована актуальность исследуемой проблемы влияния осмолитов на функционирование ферментов, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, отражены ее научная новизна, теоретическая и практическая значимость, перечислены положения, выносимые на защиту. Также приведены данные об апробации работы, публикациях соискателя по теме диссертации и прочая информация о работе.

Глава 1 посвящена литературному обзору современного состояния проблемы. В разделе 1.1 обсуждается роль осмолитов в живой клетке, в разделе 1.2 – их влияние на структурно-динамические характеристики белков, строение и состав их сольватационных оболочек, взаимодействие осмолитов с функционально важными участками белков. В разделе 1.3 описаны подходы к моделированию окружения ферментов с помощью метода молекулярной динамики, а в разделе 1.4 – структурно-функциональные особенности двух бактериальных люцифераз – *Vibrio harveyi* и *Photobacterium leiognathi*.

В **главе 2** подробно описаны используемые вычислительные методы и подходы, включая молекулярно-динамическое моделирование и анализ полученных траекторий.

В **главе 3** приведены результаты исследований структуры и динамики люцифераз в присутствии различных осмолитов на основе метода молекулярной динамики. Обсуждены сходства и отличия поведения двух различных люцифераз в присутствии ряда осмолитов, отличающихся по природе и размеру молекулы.

В **главе 4** обсуждаются результаты исследований влияния температуры и присутствия осмолитов на структурно-динамические характеристики люцифераз, прежде всего с точки зрения подвижности аминокислотной цепи в целом и отдельных остатков, а также взаимодействий осмолитов с субстратами люциферазы.

В **заключении** приведены основные результаты и выводы диссертационной работы.

Полученные результаты и сделанные по ним выводы представляются достоверными. В работе использованы стандартные пакеты программ для молекулярно-динамического моделирования и анализа траекторий. Публикации по теме исследования в полной мере отражают материалы работы, представленной к защите. Результаты опубликованы в 8 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и включенных в базы данных WoS и Scopus, а также

обсуждены на российских и международных научных конференциях. Содержание автореферата полностью соответствует диссертации.

Результаты диссертации рекомендуются к использованию в организациях, научные коллективы которых проводят исследования в области биофизики, биоинформатики, структурной биологии с использованием методов молекулярно-динамического моделирования: Новосибирский государственный университет, Московский государственный университет, Нижегородский государственный университет, Воронежский государственный университет, Институт белка РАН, Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Казанский институт биохимии и биофизики и др.

К диссертации имеется ряд замечаний:

1. В работе для построения трехмерной структуры люциферазы *P. leiognathi* используется метод гомологичного моделирования при довольно низком сходстве первичной последовательности белков (совпадение лишь около 50% остатков). При этом не было проведено моделирования структуры с использованием алгоритма AlphaFold2, который уже достаточно давно доступен для всех желающих и стал стандартом предсказания трехмерной структуры белков, а также сравнения его результатов с моделью, полученной с помощью SWISS-MODEL.

2. При проведении расчетов следовало бы сначала уравновесить белок в воде в течение 80–100 нс, чтобы его RMSD перестало меняться и лишь затем помещать полученную структуру в растворы осмолитов. Также было бы логичнее подготовить системы с одинаковыми объемными, а не массовыми долями осмолитов.

3. При анализе предпочтительного взаимодействия молекул обычно рассматривают ближайшую сольватную оболочку, в то время как автором было проведено интегрирование до расстояния 10 Å от белка, т.е. практически по всему объему ячейки, что, вероятно, и привело к противоречию с классическими представлениями.

4. Сопоставление энергий взаимодействий (раздел 3.8) с участием осмолита и воды в системах с разным количеством молекул лишено смысла. Не имеют физического смысла и корреляции энергий взаимодействий с кинетическими параметрами реакций в таблице 3.5. К ней имеется еще ряд вопросов – каким образом получились отрицательные значения r , почему не приведено число точек данных в корреляциях, не показан их вид на графике. Если экспериментальные данные опубликованы в статье с участием автора, то почему их нет в диссертации?

5. Связанная вода не может быть обнаружена при расшифровке белковых структур методом ЯМР, как указывает автор на с. 17.

Также можно задать несколько вопросов автору:

1. Почему в работе, в которой делается попытка объяснить кинетические данные по ферментативной активности, не была поставлена наиболее очевидная вычислительная задача: рассчитать константы связывания субстратов в присутствии различных осмолитов или хотя бы проанализировать изменения положения субстрата и его динамики в активном центре под их влиянием?

2. Почему местонахождение активного центра люциферазы определялось с помощью специального сервиса, если известна рентгенографическая структура ее комплекса с субстратом?

3. Почему, несмотря на то, что число общих остатков составляет всего около 50%, автор говорит о высокой гомологичности, ссылаясь на данные о процентном содержании остатков, которое может быть близким даже в совершенно неродственных и структурно различающихся белках?

4. Почему осмопротекторы в нормальных условиях значительно не влияют на свободную энергию Гиббса белковой глобулы, если они существенно влияют на гидрофобные взаимодействия в растворе? Даже если это так, почему можно ожидать, что их присутствие в реакционной смеси не должно существенно изменять активность ферментов? На активность ферментов влияет изменение энергии активации катализируемого процесса под действием осмолита, также на нее могут влиять изменение химического потенциала субстрата и конкуренция осмолита с субстратом за активный центр.

5. Что означает фраза “Из-за сложной геометрии молекул воды и осмолитов оценить доступность активного центра на уровне молекул не представлялось возможным”?

6. Почему на рисунке 3.9 MDFF при больших расстояниях не стремится к единице, вопреки написанному?

7. Автор говорит о том, что осмолиты делятся “на три класса: 1) полиолы и сахара, 2) аминокислоты и 3) метиламины и мочевины” (с. 9). Смысл термина “метиламины” при этом остается непонятным, особенно с учетом того, что автор относит к ним N-метилированные аминокислоты саркозин и глицин-бетаин. Почему они идут в одной группе с мочевиной, а не с аминокислотами?

8. Какие важные для катализа структурные перестройки в ферменте могут завершиться за несколько фемтосекунд, как указано на с. 13 литобзора?

Работа содержит очень большое количество опечаток – по несколько штук почти на каждой странице. Уделив немного времени проверке орфографии в любом текстовом редакторе, можно было исправить большую их часть. Некоторые ошибки существенно искажают смысл написанного, например, “дегидрирование” вместо “дегидратация” (с. 19), также хочется отметить “люциферов” вместо “люцифераз” и “нарушение нативной структуры белкой”.

Приведенные замечания не влияют на общую положительную оценку работы, не затрагивают ее основные выводы, научную новизну, практическую и теоретическую значимость.

Таким образом, диссертация Суковатого Льва Алексеевича является цельной и законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи анализа влияния осмолитов на структуру и функционирование бактериальных люцифераз методами компьютерного моделирования, представляющей интерес для фундаментальной биофизики ферментативных процессов, и **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

Седов Игорь Алексеевич

Доктор химических наук (специальность 02.00.04 – Физическая химия),
доцент, ведущий научный сотрудник Химического института им. А.М. Бутлерова
Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего
образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет".
420008, Россия, РТ, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

Тел. +7 [REDACTED] 16

Электронная почта: i [REDACTED] .ru



/___ Седов И.А. ___
(расшифровка подписи)



Дата « 28 __ » __ декабря 2023 __ г.

Подпись Седова И.А. заверяю
Ученый секретарь



С.В. Белякова