

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)
142290, г. Пушкино Московской обл.,
проспект Науки, д.3.
Тел./факс: (4967)73-26-36,
e-mail: info@pncbi.ru, <https://www.pbcra.ru>
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП
5039002841/503901001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН
д.ф.-м.н. Грабарник П.Я.



28.12.2023 № 191-01-2115/844
На № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации 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

Актуальность темы

Исследование молекулярных механизмов регуляции функций белков и, особенно, ферментов, низкомолекулярными соединениями является одним из основополагающих направлений в формировании понимания жизненно важных процессов обмена веществ, лежащих в основе клеточного метаболизма, а также условий нарушения работы ферментов, приводящих к разнообразным патологическим состояниям. В последние годы, одновременно с экспериментальными методами исследований по данному направлению, активное развитие получили вычислительные методы полноатомного молекулярного моделирования, на основе которых и выполнено данное исследование. Особенный прогресс наблюдался в развитии параллельных вычислительных систем (GPU), наиболее же эффективным применением таких технологий стало ускорение вычислений молекулярной динамики больших белок-лигандных комплексов в растворах, например, таких, которые изучаются в данной работе. Таким образом, представленная диссертация обладает актуальностью как по тематике

исследования, так и по методологической части и подходам, которые были использованы для достижения поставленных целей.

Новизна исследования и полученных результатов заключается в анализе большого объема структурных данных, раскрывающих связь сольватационных эффектов с функциональными свойствами для массивного двухсубъединичного белка (бактериальной люциферазы). Автором впервые проведена реконструкция трехмерной структуры бактериальной люциферазы *Photobacterium leiognathi* («быстрой» люциферазы), исследованы её структурно-динамические свойства и выполнено сравнение с характеристиками известной кристаллической структуры люциферазы *Vibrio harveyi* («медленной» люциферазы). В ходе исследования впервые проведен сравнительный анализ молекулярных механизмов влияния осмолитов из класса полиолов и сахаров на структурно-динамические характеристики двух бактериальных люцифераз. Впервые выявлены корреляции между значениями каталитической константы бактериальной люциферазы *P.leiognathi* – в средах с осмолитами и энергией взаимодействий в системе белок-вода-осмолит.

Значимость полученных автором результатов заключается в расширении представлений о биофизических механизмах влияния микроокружения (низкомолекулярных соразтворителей) на каталитическую функцию ферментов через поверхностные взаимодействия белка со средой и изменение структуры растворителя. Представленная работа вносит вклад в понимание взаимосвязи между стабилизацией белков осмолитами и их влиянием на ферментативный катализ, что является важной фундаментальной задачей при изучении метаболизма клеток в условиях их адаптации к неблагоприятным факторам среды.

Помимо фундаментальной значимости, работа обладает и практической ценностью, поскольку результаты могут быть использованы для улучшения функциональных характеристик биоаналитических методов, основанных на ферментативных реакциях вообще, и биOLUMИнесцентных реакциях в частности, а также в других областях биотехнологии и биомедицины – где требуется обеспечение длительного хранения функционально активных биологических макромолекул, клеток, тканей.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений в представленной диссертации обеспечивается всесторонним анализом выполненных ранее научно-исследовательских работ по данной теме, выполненным статистическим анализом, а также применением хорошо зарекомендовавшего себя методологического аппарата для изучения межмолекулярных взаимодействий белков, основанного на строгих физико-математических моделях, что в целом подтверждается согласованием полученных результатов с результатами других авторов.

Содержание диссертации

Диссертация имеет классическую структуру и состоит из следующих основных разделов: введение, Глава 1 (обзор литературы по теме), Глава 2 (описание методов исследования), Главы 3-4 (описание полученных результатов), заключение и список цитируемой литературы.

В **Главе 1** автор приводит анализ сформировавшихся к настоящему моменту концепций, объясняющих механизмы влияния состава микроокружения, а именно – присутствия молекул осмопротекторов, на структурно-функциональные связи белков. Довольно большая часть литературного обзора посвящена основам метода молекулярного моделирования и анализу его применимости для изучения эффектов среды на белки и особенно ферменты. Также приведено детальное описание молекулярной структуры объекта исследования – бактериальной люциферазы, с указанием функциональной роли разных структурных элементов данного фермента. На основании проведенного анализа автор делает вывод о зависимости эффектов, как структурных, так и функциональных, производимых осмолитами на биокатализаторы, от химической природы соразтворителя, от условий воздействия (температура, концентрация) и от особенностей строения белковых глобул.

Глава 2 содержит описание протокола молекулярной динамики, которая была использована для исследования эффектов осмолитов на две бактериальные люциферазы из разных подсемейств. Автор указывает, что перед расчетом траектории молекулярной динамики модельных систем, представляющих собой «водный ящик» с молекулой белка, окруженной смесью молекул осмолитов и воды, были выполнены все необходимые этапы предварительной подготовки, обеспечивающие получение надёжных результатов расчетов полноатомной динамики исследуемого биополимера.

В *Главе 3* представлены структурно-динамические характеристики бактериальных люцифераз, полученные в присутствии осмолитов – полиолов и сахаров. Первая часть главы посвящена сравнению свойств двух люцифераз: реконструированной по гомологии структуры «быстрой» люциферазы *P. leiognathi* и кристаллизованной и разрешённой «медленной» люциферазы *V. Harveyi* (PDB ID: 3FGC). Автор показывает, что, несмотря на идентичность выполняемых функций и гомологичность последовательностей, люциферазы из двух подсемейств имеют различающуюся структуру активного центра. Это может быть причиной кинетических различий данных ферментов и обуславливать их разную чувствительность к воздействию физических и химических факторов. Среди важных для катализа параметров, которые могли быть выявлены только для люциферазы *P. leiognathi*, определены степень проникновения осмолита в полость активного центра фермента, а также энергия кулоновского взаимодействия между белком и осмолитом.

В *Главе 4* приведены результаты анализа структуры и динамики бактериальных люцифераз при изменении температуры среды, а также сравнение структурных параметров с функциональными характеристиками ферментов при температурном воздействии. На основе полученных данных сделан вывод о важной роли неструктурированной петли в процессах термоинактивации бактериальных люцифераз. Также в главе представлены данные по взаимодействию с осмолитами природных метаболитов FMN и NADH. Исходя из гипотезы о том, что атомы кислорода нуклеотидов, как правило, более доступны, чем атомы азота, для образования водородных связей с молекулами среды, особый упор был сделан на анализе характера распределения водородных связей в комплексах с FMN и NADH. Результаты молекулярного моделирования показали, что фосфатная группа обоих нуклеотидов вероятнее образует связь с молекулами глицерина, чем с сахарозой. Автор постулировано, что обнаруженные водородные связи глицерина с фосфатными группами нуклеотидов могут влиять на связывание субстратов с ферментами и, таким образом, на скорость катализа в целом.

В целом, текст диссертации написан грамотным профессиональным языком и хорошо иллюстрирован.

Однако, к оформлению некоторых иллюстраций и тексту можно высказать ряд замечаний:

1) в подписях к рисункам 3.5-3.7 (с. 64-66) не объяснено значение горизонтальных штриховых линий на панелях В;

2) на рисунке 3.11 (с. 72) название оси ординат должно быть g_{pc} , а не g_{pw} , поскольку это данные для молекул осмолитов, а не воды;

3) в примечаниях к таблице 3.3 (с. 84) должно быть указано «в обоих сайтах», а не «в обеих сайтах»;

4) в начале главы 4 (с. 111) указано, что температурные эффекты на люциферазы изучались при 30%-й концентрации сахарозы, а в заключении к главе (с. 122) указана концентрация 40%.

Также к содержанию работы имеются следующие вопросы/замечания:

1) В главе 2 не объяснено, почему для расчета молекулярного моделирования был выбран программный пакет GROMACS и силовое поле CHRAMM36;

2) Почему ни на одном из этапов работы не использовался гибкий молекулярный докинг, который как раз и предназначен для изучения комплексов, в том числе белок-лигандных?

3) Вариация концентраций других осмолитов (помимо глицерина и сахарозы) дала бы более полную картину механизмов их влияния на структурно-динамические характеристики люцифераз. Хотя следует признать, что по представленным результатам для глицерина и сахарозы значительных различий в концентрационных зависимостях не наблюдается;

4) Анализ молекулярной динамики люцифераз в присутствии этиленгликоля при низких температурах также был бы хорошим дополнением к данному исследованию, поскольку на примере других белков известно, что этот осмолит при таких условиях оказывает стабилизирующее действие.

В целом же, несмотря на высказанные замечания, представленную диссертацию следует признать состоявшимся научным исследованием, выполненным на высоком технико-методологическом уровне.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Основные результаты диссертации опубликованы в научных изданиях в виде восьми статей, как в российских, так и международных рецензируемых журналах, что свидетельствует о том, что данная работа успешно прошла апробацию в научном сообществе.

Заключение

Таким образом, диссертация Суковатого Льва Алексеевича является научно-квалификационной работой, в которой содержится **решение задачи** выявления молекулярных механизмов воздействия природных осмолитов на функциональные характеристики ферментов, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний, 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 учёной степени.

Отзыв подготовлен кандидатом физико-математических наук, старшим научным сотрудником ИБК РАН, заведующим Лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем ИБК РАН Кондратьевым М.С.

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании теоретического семинара Института биофизики клетки РАН, протокол № 1 от «27» декабря 2023 г.

Заведующий Лабораторией структуры и динамики
биомолекулярных систем ИБК РАН,

к.ф.-м.н. _____ М.С. Кондратьев

Дата 28.12.2023

Подпись Кондратьева М.С.
удостоверен
Нач. отд. кадров *Т.Н. Левченко*



Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН) – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д.3.
+7 (4967) 73-94-79, +7 (4967) 33-05-09

a _____psn.ru

m _____ru