

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

ФГАОУ ВО «Сибирский
федеральный университет»

Денис Сергеевич Гуц



«17» октября 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Диссертация «Молекулярно-динамический анализ влияния осмолитов на структуру бактериальных люцифераз» выполнена на кафедре биофизики.

В период подготовки диссертации соискатель Суковатый Лев Алексеевич обучался в аспирантуре ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» и работал в должности ассистента кафедры биофизики, а также младшего инженера-исследователя лаборатории биolumинесцентных биотехнологий ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет».

Диплом об окончании аспирантуры по направлению 06.06.01 «Биологические науки» с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь» выдан в 2022 г. ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет».

Научный руководитель – Немцева Елена Владимировна, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории биolumинесцентных биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения

На заседании присутствовали: Кратасюк В. А., д-р биол. наук, профессор; Белобров П. И., д-р физ.-мат. наук, ст. науч. сотр.; Коленчукова О. А., д-р биол.

наук, доцент; Слюсарева Е. А., д-р физ.-мат. наук, доцент; Рогозин Д. Ю., д-р биол. наук, доцент; Немцева Е.В., канд. физ.-мат. наук, доцент; Суковатая И. Е., канд. биол. наук, доцент; Буракова Л. П., канд. биол. наук; Степанова Л. В., канд. биол. наук; Задереев Е. С., канд. биол. наук, доцент; Зотина Т. А., канд. биол. наук, доцент; Сарангова А. Б., канд. биол. наук, доцент; Еремеева Е. В., канд. биол. наук; Красицкая В. В., канд. биол. наук; Сутормин О. С., канд. биол. наук; Деева А. А., канд. физ.-мат. наук; Лисица А. Е., Калябина В. П., Самойлова А. А., Жукова Г. В.

Были заданы вопросы:

- 1) С чем предпочтительнее взаимодействует бактериальная люцифераза в растворе: с водой или с осмолитом?
- 2) Сколько молекул растворителя могут войти в активный центр люциферазы?
- 3) Связано ли вытеснение этиленгликолем молекул воды из активного центра люциферазы с выполнением ее каталитической функции?
- 4) Объясните механизм сохранения ферментативной функции люциферазы при изменении температуры в присутствии сахарозы?
- 5) К каким структурно-динамическим изменениям приводит проникновение осмолитов в активный центр люцифераз?
- 6) Согласуются ли результаты теоретического моделирования с экспериментальными данными?
- 7) Возможно ли решить обратную задачу: по известным характеристикам осмолита предсказать его влияние на фермент?
- 8) Насколько точно реконструированная по гомологии структура люциферазы совпадает с уже известными кристаллическими структурами?

На все вопросы соискатель дал исчерпывающие ответы.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Суковатого Л. А. «Молекулярно-динамический анализ влияния осмолитов на структуру бактериальных люцифераз»,

представляемая на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика, посвящена изучению механизмов влияния осмолитов (полиолов и сахаров) на структурно-динамические характеристики бактериальных люцифераз.

Актуальность исследования. К настоящему моменту не сформировано окончательное понимание молекулярных механизмов влияния осмолитов на функционирование ферментов. Между тем, выяснение этих механизмов важно для получения целостной картины организации метаболизма клеток, находящихся в неблагоприятных условиях, а также для определения связи динамических свойств белков с их функциональной активностью (соотношение структура-динамика-функция) и роли низкомолекулярных соединений в этом соотношении. Кроме того, прояснение молекулярных механизмов действия осмолитов поможет усовершенствовать технологии их использования в фармакологии, биомедицине и других областях, где требуется сохранение в течение длительного времени нативных свойств белков, клеток, тканей. Вычислительные методы молекулярного моделирования позволяют детально исследовать межмолекулярные взаимодействия, лежащие в основе биологических процессов и явлений.

Целью работы было определение роли структурно-динамических механизмов в эффектах осмолитов (полиолов и сахаров) на функциональные свойства бактериальной люциферазы, методами молекулярной динамики.

Научная новизна. В работе впервые было охарактеризовано влияние осмолитов (полиолов и сахаров) на структурно-динамические характеристики двух высоко гомологичных люцифераз бактерий *Vibrio harveyi* и *Photobacterium leiognathi*. Для этого было проведено полноатомное молекулярное моделирование ферментов в средах с различной концентрацией низкомолекулярных добавок. Впервые было проведено реконструирование еще нерасшифрованной трехмерной структуры *P. leiognathi*. Показано, что способность осмолитов проникать в активный центр люцифераз является одним

из важных механизмов влияния на эффективность протекания биOLUMИнесцентной реакции. Также установлено, что повышение термостабильности люцифераз в присутствии сахарозы сопровождается взаимодействием молекул осмолита с функционально важной мобильной петлёй фермента. Впервые проанализирована корреляция между результатами теоретического моделирования бактериальных люцифераз в растворах осмолитов и экспериментальными данными по активности ферментов в этих средах.

Практическая значимость полученных результатов определяется возможностью их использования для усовершенствования технологий использования осмолитов в фармакологии, биомедицине и других областях, а также для улучшения функциональных характеристик ферментативных аналитических систем, основанных на биOLUMИнесцентных реакциях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Воздействие осмолитов (полиолов и сахаров) на функционирование бактериальной люциферазы обусловлено способностью проникновения их молекул в полость активного центра, а также специфического взаимодействия с заряженными аминокислотными остатками белка.
2. Значение каталитической константы бактериальной люциферазы *P. leiognathi* проявляет положительную корреляцию с энергией электростатического взаимодействия белка с осмолитами (полиолами и сахарами) и отрицательную корреляцию с энергией ван-дер-ваальсовых взаимодействий молекул осмолитов друг с другом и/или с водой.
3. Замедление термоинактивации бактериальной люциферазы сахарозой обусловлено снижением динамики мобильной петли фермента вследствие взаимодействия молекул осмолита с заряженными и полярными аминокислотными остатками.

Личный вклад соискателя. Представленные в работе результаты были получены либо автором самостоятельно, либо при его непосредственном

участии. Автор принимал участие во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов до проведения расчетов с последующим анализом, обобщением и интерпретацией результатов.

Достоверность полученных результатов подтверждена достаточным объемом данных, их воспроизводимостью, а также использованием современных методов исследования и статистического анализа при проведении научной работы.

Апробация результатов работы проводилась на конференциях и других научных мероприятиях российского и международного уровня.

Основные результаты работы были представлены в виде докладов на следующих научных конференциях: VI Съезде биофизиков России (16-21 сентября 2019 г., г. Сочи), конференции молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (29 апреля 2020 г., г. Красноярск), XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов–2021» (12-23 Апреля 2021, г. Москва), XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспектив-2021» (19-24 апреля 2021 г., г. Красноярск), Международной мультikonференции «Биоинформатика геномной регуляции и структурной/системной биологии» – BGRS/SB-2022 (4-8 июля 2022 г., г. Новосибирск), а также на научных семинарах кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ и лаборатории биолюминесцентных биотехнологий СФУ.

Работа отмечена следующими наградами: стипендией Фонда Осаму Шимомура за успешное исследование в области биолюминесценции в 2021 году.

Диссертационная работа была выполнена при поддержке следующих проектов:

Российский фонд фундаментальных исследований, № 20-44-243002 р_мол_а_Красноярск и №18-44-243009 р_мол_а; Российский фонд фундаментальных исследований в рамках конкурса «Аспиранты» (проект № 20-34-90118).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем.

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 8 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК России и индексируемых в базах Web of Science и/или Scopus.

Публикации, входящие в международные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus:

1. Лисица А. Е. Вязкие среды замедляют распад ключевого интермедиата биолюминесцентной реакции бактерий / А. Е. Лисица, **Л. А. Суковатый**, В. А. Кратасюк, Е. В. Немцева // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 492. – №. 1. – С. 320-324. (Lisitsa A. Viscous media slow down the decay of the key intermediate in bacterial bioluminescent reaction / A. Lisitsa, **L. Sukovaty**i, V. Kratasyuk, E. Nemtseva // Doklady Biochemistry and Biophysics. – Pleiades Publishing, 2020. – Vol. 492. – I. 1. – P. 162-165.) Q3
2. **Суковатый Л. А.** Влияние осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты / Л. А. Суковатый, А. Е. Лисица, В. А. Кратасюк, Е. В. Немцева // Биофизика. – 2020. – Т. 65. – №. 6. – С. 1135-1141. (**Sukovaty**i L. A. The effect of osmolytes on the bioluminescent reaction of bacteria: structural and dynamic properties // Biophysics. – 2020. – Vol. 65. – I. 6. – P. 966-971.) Q4
3. Lisitsa A. Mechanisms of viscous media effects on elementary steps of bacterial bioluminescent reaction / A. Lisitsa, **L. Sukovaty**i, S. Bartsev, A. Deeva, V. Kratasyuk, E. Nemtseva // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – I. 16. – P. 8827. Q1
4. Nemtseva E. V. Bacterial luciferases from *Vibrio harveyi* and *Photobacterium leiognathi* demonstrate different conformational stability as detected by time-resolved fluorescence spectroscopy / E. Nemtseva, D. Gulnov, M. Gerasimova, **L. Sukovaty**i, L. Burakova, N. Karuzina, B. Melnik, V. Kratasyuk

// International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – I. 19. – N. 10449. Q1

5. Deeva A. Structure-function relationships in temperature effects on bacterial luciferases: nothing is perfect / A. Deeva, A. Lisitsa, **L. Sukovaty**, T. Melnik, V. Kratasyuk, E. Nemtseva // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – I. 15. – N. 8119. Q1
6. Гульников Д.В. Влияние вязких сред на фотофизические характеристики флавиномононуклеотида / Д.В. Гульников, М.А. Герасимова, **Л.А. Суковатый**, Е.В. Немцева // Известия РАН. Серия физическая. – 2022. – Т. 86. – No.10. – С. 1444–1451. (Gulnov D. Effect of viscous media on the photophysical characteristics of flavin mononucleotide / D. Gulnov, M. Gerasimova, **L. Sukovaty**, E. Nemtseva // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2022. – Vol. 86. – I. 10. – P. 1196-1202.) Q3
7. Lisitsa A. The role of cosolvent–water interactions in effects of the media on functionality of enzymes: a case study of *Photobacterium leiognathi* luciferase / A. Lisitsa, **L. Sukovaty**, A. Deeva, D. Gulnov, E. Esimbekova, E. Nemtseva, V. Kratasyuk // Life. – 2023. – Vol. 13. – I. 6. – N. 1384. Q2
8. Sutormin O. Coupling of NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and luciferase from luminous bacteria in a viscous medium: finding the weakest link in the chain / O. Sutormin, E. Nemtseva, D. Gulnov, **L. Sukovaty**, Y. Tyrtysnaya, A. Lisitsa, V. Kratasyuk // Photochemistry and Photobiology. – 2023. DOI: 10.1111/php.13845. Q2

Прочие публикации:

1. **Суковатый Л. А.** Механизмы влияния осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий / **Л. А. Суковатый**, А. Е. Лисица // Ломоносов - 2021 : материалы Международного молодежного научного форума, Москва, 12–23 апреля 2021 года. – Москва: ООО "МАКС Пресс", 2021.

2. **Суковатый Л. А.** Роль специфических взаимодействий в эффекте вязких сред с глицерином и сахарозой на биолюминесцентную реакцию бактерий / **Л. А. Суковатый**, А. Е. Лисица, Е. В. Немцева // VI Съезд биофизиков России : сборник научных трудов, Сочи, 16–21 сентября 2019 года. Том 1. – Сочи: ООО Полиграфическое объединение «Плехановец», 2019. – С. 89-90.
3. Структурно-функциональные особенности бактериальных люцифераз / Е. В. Немцева, А. Е. Лисица, А. А. Деева, **Л.А. Суковатый** [и др.] // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России, Сочи, 16–21 сентября 2019 года. Том 2. – Сочи: ООО Полиграфическое объединение «Плехановец», 2019. – С. 124.
4. Molecular modeling of osmolytes' effect on bacterial luciferase / **L. A. Sukovatyi**, A. E. Lisitsa, A. A. Deeva [et al.] // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022) : Abstracts the Thirteenth International Multiconference, Novosibirsk, 04–08 июля 2022 года. – Novosibirsk: Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 2022. – P. 329. – DOI 10.18699/SBB-2022-184.
5. Structural features of bacterial luciferase related to temperature adaptation / A. A. Deeva, **L. A. Sukovatyi**, A. E. Lisitsa, E. V. Nemtseva // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022) : Abstracts the Thirteenth International Multiconference, Novosibirsk, 04–08 июля 2022 года. – Novosibirsk: Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 2022. – P. 281. – DOI 10.18699/SBB-2022-157.

Диссертация Суковатого Льва Алексеевича удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, и **соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика (физико-математические науки)** (пп. 1.1, 1.2).

Заключение.

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

Заключение принято на расширенном заседании кафедры биофизики с привлечением профильных специалистов.

Присутствовало на заседании 20 чел., из них с правом решающего голоса – 16 чел. Результаты голосования: «за» – 20 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол №23 от «30» июня 2023 г.



Председатель заседания
Кратасюк Валентина Александровна,
д-р биол. наук, профессор,
заведующая кафедрой биофизики