

ОТЗЫВ

официального оппонента по диссертации Хреновой Марии Григорьевны «Интерпретация и прогнозирование свойств белковых систем методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования», представленной на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 02.00.17 – математическая и квантовая химия

Диссертационная работа М.Г. Хреновой посвящена теоретическому изучению структурно-функциональных свойств ряда биологических объектов – белков, ферментов, фотосинтетических пигмент-белковых комплексов. Такое исследование проведено с применением подходов квантовой химии и молекулярной механики (КМ/ММ) с помощью компьютерных расчетов. Данный подход дает возможность с хорошей надежностью получать детальную информацию на атомарном уровне о механизмах функционирования больших (сотни тысяч атомов) белковых систем. В настоящее время он широко используется для интерпретации экспериментальных данных по ферментативному катализу, для расчетов структурной организации сложных биологических систем и во многих других случаях. Более того, как продемонстрировано в диссертационной работе, этот метод позволяет проводить поиск новых практически полезных свойств белков и фотоактивных простетических групп, возникающих в результате введения в белки точечных мутаций. Признанием эффективности КМ/ММ расчетов послужило присуждение его основным разработчикам Нобелевской премии 2013 года. К сожалению, использование этих методов российскими исследователями несколько отстает от мирового уровня. В работе М.Г. Хреновой предпринята успешная попытка сокращения такого отставания, и проведено широкое исследование ряда биологических процессов методами ММ и КМ/ММ с тщательным анализом корректности выбранных подходов и полученных результатов. Таким образом, актуальность представленной работы и ее большое научное значение не вызывают сомнений.

Диссертация М.Г. Хреновой состоит из введения, описания результатов исследования, детального обсуждения результатов, выводов и положений, выносимых на защиту, и состоит из 5 глав. Список литературы насчитывает 285 наименований.

Обзор литературных данных не вынесен в отдельную главу. Описание каждого нового исследования, проведенного М.Г. Хреновой, предваряется обсуждением положительных качеств и недостатков предшествующих работ в соответствующей области, что представляется вполне обоснованным.

Во Введении к диссертации рассматриваются сущность тех проблем, которые решаются в работе. Дается обоснование научной значимости решаемых проблем. Сформулированы цели и задачи исследования. Обсуждаются научная новизна поставленных задач, достоверность полученных результатов, научная и практическая значимость работы. Приводятся положения, выносимые на защиту.

Глава 1 состоит из двух основных частей. В первой описываются методы молекулярной динамики, квантовой химии, комбинированный метод КМ/ММ, а также общий алгоритм решения задач. Вторая часть содержит два конкретных примера – теоретическое исследование методом КМ/ММ ферментативного акта гидролиза пенициллина G пенициллинацилазой и расчет методом ММ связывания ионов Ca^{2+} с белковой частью т.н. кóровой (центральной) светособирающей антенны LH1 фотосинтезирующей бактерии *Thermochromatium tepidum*. Интерес к связыванию кальция определяется его ролью в повышении термостабильности антенны этой бактерии, важном для практических применений свойстве. Расчеты проводились в рамках реалистичной модели, в которой пигмент-белковый комплекс помещен в бислойную липидную мембрану и сольватирован молекулами воды. Повышение термостабильности связано с тем, что ион Ca^{2+} взаимодействует с аминокислотами соседних α -спиралей, увеличивая жесткость белка. Еще одним полезным результатом расчетов является вывод о возможных отличиях между данными рентгеноструктурного анализа и ММ расчетов, связанных с различиями в окружении белка в мембране и в монокристалле. В КМ/ММ расчетах пенициллинацилазы опробованы несколько протоколов расчета, отличающихся выбором квантовомеханической части фермент-субстратного комплекса, а также использованными в вычислениях функционалами. Продемонстрирована достаточно хорошая устойчивость получаемых решений.

В Главе 2 подробно описаны результаты моделирования ферментативной активности матричной Zn-содержащей протеазы 2 (ММР-2). ММР-2 – это внеклеточный фермент, выполняющий в организме большое число жизненно важных функций (например, принимает участие в ангиогенезе при развитии опухолей). Данную главу можно считать центральной в диссертации, по крайней мере, с точки зрения разработки методологии расчетов ферментативных процессов. Изложению собственных результатов предшествует подробный критический анализ имеющихся литературных данных о моделировании этого и других подобных ферментов. Выделены основные факторы, повлиявшие на неудачу моделирования ферментативного процесса: небольшие размеры КМ кластеров,

недостаточный учет полей, создаваемых белком и окружающим растворителем, плохой выбор исходной структуры фермент-субстратного комплекса. Все это приводило к получению в расчетах недопустимо высоких потенциальных барьеров некоторых стадий реакции. В работе М.Г. Хреновой эти недостатки были учтены и исправлены. Был проведен тщательный анализ влияния на результат расчета таких факторов, как сольватация, проведено глубокое исследование влияния выбора функционала электронной плотности и стартовой структуры. Показано, что в случае Zn-содержащих ферментов применение упрощенных процедур с целью ускорения вычислений приводит к недопустимо большим погрешностям. Критериями успешности моделирования на этой стадии работы служили достаточно низкие вычисляемые потенциальные барьеры ферментативного процесса и реализация разумных межатомных расстояний. В целом необходимо отметить, что проблема подтверждения надежности (верификация) полученных решений в области суперкомпьютерного моделирования белковых систем стоит достаточно остро, поскольку получаемая в таких работах тонкая информация на атомарном уровне разрешения в большинстве случаев не может быть непосредственно проверена в эксперименте. Это вызывает необходимость поиска косвенных способов верификации. В данной работе верификации получаемых решений уделяется большое внимание. В этой и последующих главах с этой целью использованы такие факторы, как влияние на ферментативную активность введения точечных белковых мутаций, сравнение с экспериментом расчетов влияния различных ингибиторов, сравнение, где это возможно, с результатами рентгеноструктурного анализа, влияния дейтерирования, расчеты колебательных частот наиболее важных атомных групп. Все это приводит к достаточно убедительным результатам, имеющим высокую надежность.

Следует отметить еще один важный результат, приведенный в Главе 2. На основе проведенных вычислений были предложены новые ингибиторы - олигопептиды, которые в результате экспериментальной проверки подтвердили свою эффективность. Таким образом, продемонстрирована имеющая большое практическое значение возможность прогнозирования свойств используя описанные вычислительные подходы.

В Главе 3 исследуется механизм реакции ферментативного гидролиза ГТФ и влияние белков-ускорителей на этот процесс. Рассмотрены два белковых комплекса, имеющие существенный интерес с медицинской точки зрения. В случае т.н. Ras-GAP комплекса получено детальное описание кинетики гидролиза ГТФ,

хорошо совпадающее с литературными экспериментальными данными. Показано, что стадия диссоциации комплекса фермент-продукт определяет общую скорость ферментативного процесса. Выявлены причины замедления реакции в случае двух точечных мутаций белка Ras. Проведен анализ ферментативной активности белкового комплекса Arl3-RP2. Показано, что некоторые промежуточные стадии гидролиза ГТФ могут быть долгоживущими, и целесообразно провести поиск их спектральных проявлений. Для обоих комплексов проведено сравнение расчетных и экспериментальных колебательных спектров некоторых стадий, и показано их хорошее соответствие.

Главы 4 и 5 посвящены исследованию белков, содержащих фотоактивные простетические группы, функционирование которых связано с переходом этих групп в электронно-возбужденные состояния. В Главе 4 рассмотрены флавино-содержащие белки, относящиеся к семействам BLUF и LOV. Эти белки играют роль сенсоров освещенности в широком круге организмов – в высших растениях, цианобактериях и одноклеточных водорослях, фототрофных бактериях, а также в ряде гетеротрофных организмов. Механизм фотоактивности этих белков представляет большой интерес. Сложность исследования в данной области связана с тем, что структурные перестройки белка при переходе из рецепторной в сигнальную форму белка не носят ярко выраженного характера. М.Г. Хреновой построена успешная схема таких переходов, которая соответствует имеющимся рентгеноструктурным данным. Изучен процесс передачи сигнала от рецепторного BLUF домена к EAL домену белка и определены белковые области, ответственные за такую передачу сигнала. Построена модель возврата белка из сигнального в рецепторное состояние. Верификация полученных результатов, кроме сравнения со структурными данными, проводилась путем соотнесения с экспериментальными данными по спектрам поглощения в видимой области и колебательным спектрам. В этом же разделе рассчитаны фотофизические свойства молекул флавина в изолированном состоянии и в растворе. Исследование флуоресцирующего варианта LOV белка позволило предложить точечную мутацию, смещающую полосы поглощения и флуоресценции в длинноволновую область, в случае флуоресценции приблизительно на 90 нм, что может иметь практические приложения.

Каспазами называют группу ферментов-протеаз, играющих важную роль в процессах программируемой смерти клеток и, следовательно, представляющих большой интерес с точки зрения разработки методов лечения онкологических

заболеваний. Глава 5 посвящена изучению FRET-сенсоров каспазы на основе белковых донора и акцептора энергии, связанных олигопептидным линкером. Проведенные расчеты позволили предложить структуру линкера, обеспечивающую увеличенный FRET эффект. Последующий синтез такого сенсора в ФИЦ Биотехнологии РАН подтвердил его предсказанные свойства. В Главе 5 описаны также исследования сенсора с участием тербий-связывающего белка, белков, фотопереключаемых за счет фотоизомеризации хромофора, а также ряд других работ.

Оценивая в целом диссертацию М.Г. Хреновой необходимо отметить очень большой объем проделанных исследований, высокую степень достоверности и надежности полученных результатов, их новизну. Представленная работа является важным шагом в развитии нового перспективного научного направления – компьютерного молекулярного моделирования белковых систем.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Материалы работы М.Г. Хреновой достаточно полно отражены в 35 публикациях автора в ведущих российских и международных журналах, многократно докладывались на отечественных и международных конференциях.

Диссертационная работа написана в хорошем научном стиле, хотя и в отдельных местах (Глава 5) излишне кратко; она не лишена отдельных недостатков:

- трудно полностью согласиться с утверждением, сделанным при обсуждении ингибиторов металлопротеиназы (с. 39), что ингибиторы на основе олигопептидов «...не являясь ксенобиотиками, будут наносить меньше вреда организму». Наиболее эффективные токсины ядовитых змей, грибов и насекомых как раз представляют собой олигопептиды, хотя и в большинстве случаев циклические;
- при обсуждении результатов расчета профиля потенциальной энергии ферментативной реакции гидролиза ГТФ (с. 95) константа скорости реакции образования первого промежуточного состояния почти на четыре порядка меньше, чем для обратной реакции. Не вполне понятно, как при таком соотношении может эффективно протекать эта реакция;
- не вполне понятен физический смысл электронной плотности и плотности положительного заряда, возникающие в пустом пространстве при расчете возбужденных состояний хромофора GFP (раздел 5.5 Главы 5).

Имеются и более мелкие замечания технического характера: на с. 22 отсутствуют данные о принятой в расчетах исходной структуре пенициллинацилазы, на с. 122

вместо «полухинона флавина» желательнее было бы использовать общепринятый термин «семихинон», на с. 164 в приведенной формуле Фёрстера допущена неточность – интеграл перекрывания это постоянная для данных донора и акцептора величина, а не функция длины волны; эта погрешность никак не повлияла на дальнейшие выкладки.

Сделанные замечания, естественно, не влияют на общую положительную оценку работы и, таким образом, можно сделать вывод, что диссертационная работа М.Г. Хреновой «Интерпретация и прогнозирование свойств белковых систем методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования» полностью отвечает всем критериям пункта 9 Положения о порядке присуждения учёных степеней, утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 года в редакции от 21.04.2016 года, а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 02.00.17 – математическая и квантовая химия.

23.10.2016

Заведующий лабораторией молекулярной спектроскопии,
ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН
д.ф.-м.н. (03.00.02 – биофизика)



Иван Игоревич Проскуряков

Адрес:

142290, г. Пущино, Московская обл.,

Институт фундаментальных проблем биологии РАН

<http://www.ibbp.psn.ru/>

тел: +74967733601

e-mail: pros@issp.serpukhov.su

