

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



(ИПХФ РАН)

142432, Московская обл., город Черноголовка,  
проспект академика Семенова, 1

Тел.: 8(495) 993-57-07; 8(49652) 2-19-30  
Факс: 8(49652) 2-56-36; 8(49652) 2-35-07

ОКПО 02699837, ОГРН 1035006100502  
ИНН/КПП 5031007735/503101001

26.10.16 № 12108-0215/7713

На № \_\_\_\_\_

Московский государственный  
университет им. М.В.Ломоносова  
Химический факультет

119991, Москва, ГСП-1,  
Ленинские горы, д. 1, стр. 3

Председателю  
диссертационного совета  
Д 501.001.50  
д.х.н., проф. Немухину А.В.

Институт проблем химической физики РАН направляет Вам отзыв ведущей организации на диссертационную работу Хреновой Марии Григорьевны «Интерпретация и прогнозирование свойств белковых систем методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования», представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 02.00.17 – математическая и квантовая химия (физико-математические науки).

Сообщаем коды нашей организации:  
ОКПО - 02699837, ОКОНХ - 95110,  
СОАТО - 1146239568, СООГУ - 07614.

Ученый секретарь ИПХФ РАН

д.х.н

Б.Л. Психа



Зам. директора ФГБУН  
Института проблем  
химической физики РАН  
Э.Р. Бадамшина

“25” октября 2016 г.

**ОТЗЫВ**  
**ведущей организации**  
**Федерального государственного бюджетного учреждения науки**  
**Института проблем химической физики РАН**

на диссертационную работу

Хреновой Марии Григорьевны

«Интерпретация и прогнозирование свойств белковых систем методами  
суперкомпьютерного молекулярного моделирования»,

представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по  
специальности 02.00.17 – математическая и квантовая химия

В последние годы в связи с успешным развитием и применением к биологическим системам многомасштабных моделей квантовой химии, за которое М. Карплусу, М. Левитту и А. Варшелу была присуждена Нобелевская премия по химии в 2013 году, стала формироваться новая область науки квантовая биология. Одной из ключевых основ функционирования биологических систем являются ферментативные процессы. Поэтому наблюдается все возрастающий интерес к изучению механизмов ферментативных реакций, а также фотохимических процессов в фоторецепторных системах. Продвижение в этом направлении помимо несомненного фундаментального значения таит многообещающие практические приложения. Так, изучение молекулярных механизмов действия ферментов человека позволяет формулировать способы контроля их каталитической активности и на этом пути разрабатывать ингибиторы данных ферментов. Бактериальные ферменты зачастую используются в промышленных процессах, и для их более эффективного применения востребована целенаправленная модификация. Флуоресцентные белки широко применяются в качестве биомаркеров в живых системах, однако фотофизические превращения в этих системах еще далеки от полного понимания. Таким образом, диссертационная работа Хреновой М.Г. «Интерпретация и прогнозирование свойств белковых систем методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования», которая посвящена разработке адекватных подходов

суперкомпьютерного молекулярного моделирования для интерпретации экспериментальных данных и прогнозирования свойств белковых систем с требуемой для опытной проверки точностью, включая: поиск путей ингибирования ферментов на основе механизмов реакций ферментативного катализа; разработку перспективных вариантов фоторецепторных белков для использования в качестве биомаркеров; предсказание структур сложных белковых комплексов является несомненно актуальной.

#### Структура работы и основные результаты:

Диссертация Хреновой М.Г., объемом 243 страницы машинописного текста, включая 138 рисунков и 25 таблиц, состоит из введения, 5-ти глав, основных результатов и выводов, списка цитируемой литературы из 285-ти наименований.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы и выбор рассматриваемых объектов и применяемых методов. Сформулированы научная новизна и практическая значимость результатов, а также отмечен личный вклад в представленные результаты.

В первой главе рассматриваются современные методы молекулярного моделирования и проводится критический анализ области их применимости в контексте выбранных систем и поставленных задач. В качестве примеров приведены расчеты профиля поверхности потенциальной энергии для гидролиза пенициллина пенициллинацилазой и поиск сайтов связывания катионов кальция с бактериальным фотосинтетическим центром. В итоге, на основании верификации полученных результатов путем сравнения с доступными экспериментальными данными, предложен протокол расчета, адекватный для рассматриваемых и родственных объектов.

Во второй главе представлены результаты изучения ферментативной реакции в активном центре матричной металлопротеиназы MMP-2 . В этом случае проведен полный цикл исследований, включающий изучение механизма протеолиза, поиск новых ингибиторов и экспериментальную проверку их действия. Кроме того, рассмотрены методические вопросы, связанные с моделированием процессов в активных центрах ферментов, содержащих двухзарядный катион цинка, полярирующий систему, и даны рекомендации по выбору соответствующего протокола. Полученные данные о молекулярном механизме реакции позволили предложить ингибиторы на основе олигопептидов и их миметиков, которые впоследствии были синтезированы и успешно прошли экспериментальную проверку *in vitro*.

В третьей главе рассматриваются результаты изучения реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ) комплексами малых гуанозинтрифосфатаз с белками-ускорителями. На основании рассчитанного энергетического профиля реакции выявлено 5 обратимых стадий, в ходе которых происходит разрыв связи между атомом фосфора концевой фосфатной группы и мостиковым атомом кислорода, сопровождающийся тауомеризацией участвующего в реакции глутаминового остатка и последующей регенерацией исходной структуры активного центра. Теоретические значения констант скорости элементарных стадий в сочетании с численным решением соответствующих кинетических уравнений приводят к рассчитанной эффективной константе скорости для всего процесса, которая находится в количественном согласии с экспериментальными данными по кинетике единичного каталитического цикла. Интересным результатом является вывод о наличии интермедиатов, которые могут быть обнаружены с помощью ИК-спектроскопии с временным разрешением, в реакции гидролиза ГТФ белковым комплексом Arl3-RP2, что позволяет дополнительно верифицировать предложенный механизм.

В четвертой главе представлены результаты моделирования флавин-содержащих белков, включая бактериальные рецепторы синего света BLUF и флуоресцентный белок iLOV. Для BLUF доменов описан полный фотоцикл, включая фотореакцию и возвращение в исходного рецепторное состояние в результате протонирования глутамина боковой цепи с участием консервативного остатка гистидина. На основании полученных данных интерпретированы наблюдаемые фотохимические свойства флуоресцентного белка iLOV, являющегося альтернативой широко известным белкам семейства зеленого флуоресцентного белка и предложена мутация, приводящая к смещению максимумов полос поглощения и флуоресценции в красную область, что может добавить новый цвет в палитру флуоресцентных белков на основе флавина.

В пятой главе рассматриваются результаты изучения сенсора на каспазу-3, работающего по принципу резонансно-индуктивного переноса энергии между флуоресцентным белком TagRFP и хромопротеином KFP, соединенных гибким связующим олигопептидом с аминокислотным мотивом, специфически распознаваемым каспазой-3. Полный анализ всех факторов, влияющих на резонансно-индуктивный перенос энергии, показал, что наиболее эффективным подходом к улучшению свойств сенсора является модификация структуры связующего олигопептида. По результатам проведенных расчетов был предложен новый связующий олигопептид, который был использован при синтезе нового сенсора. Его тестирование *in vitro* и *in vivo* в контрольном

эксперименте с целевым ферментом показал расширение динамического диапазона, что свидетельствует об улучшении характеристик сенсора.

Объем полученных данных весьма значителен, о чем свидетельствует количество публикаций автора в ведущих российских и международных журналах. Среди материалов диссертационной работы следует выделить целый ряд полученных автором результатов, представляющих наибольшее практическое значение:

- Теоретически найденные ингибиторы на основе олигопептидов и их миметиков могут быть использованы в качестве прототипов для создания терапевтических средств борьбы с метастазированием.
- Предложенная в результате расчетов точечная мутация Q489K в белке iLOV добавляет новый цвет в палитру флуоресцентных белков на основе флавина.
- Расширение динамического диапазона в предсказанном сенсоре на основе флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP дает возможность более точного определения активности каспазы-3 в клетках и тканях.

В работе применяются методы молекулярного моделирования, зарекомендовавшие себя в течение последних лет в качестве достаточно надежных и обладающих высокой предсказательной способностью при изучении процессов в биологических макромолекулах. На всех этапах работы автор проводит сравнение рассчитанных теоретических значений с имеющимися экспериментальными данными, что обеспечивает высокую надежность полученных результатов.

В целом диссертационная работа Хреновой М. Г. выполнена на высоком уровне, но не лишена отдельных недостатков, которые, в основном, относятся к форме представления результатов и заключаются в смысловых и стилистических погрешностях, редко встречающихся опечатках или чрезмерно лапидарном изложении материала.

Так на стр. 36 и в других местах написано "координационная сфера магния" вместо координационная сфера атома магния. На стр. 49 и в других местах написано "каталитическая молекула воды" вместо молекула воды, участвующая в каталитическом цикле. На стр. 53 написано "меньшие значения координационной связи". На стр. 73 выражение цинковый палец следовало бы писать в кавычках. Также нельзя признать удачными обозначения выделенных атомов в третьей главе с помощью нижнего индекса, конфликтующие с их традиционным применением в химии. Так, если согласиться, что на стр. 92  $P_{\gamma}O_3^-$  является формулой метафосфат-иона, а не какого-то нестехиометрического

соединения, то тогда в выражении " $P_{\gamma}$ - $O_2$  связи" на стр. 95 следует усмотреть молекулу кислорода.

На стр. 51 говорится о визуальной инспекции структуры активного центра для отбора кадров, но не указаны использованные критерии отбора, причем на рис. 2.12 на стр. 53 неясно, какие именно профили потенциальной энергии получены с использованием визуальной инспекции

На стр. 72 не приведены основания для выбора конкретного псевдоолигопептида из 8 звеньев.

На стр. 86 в вводной части главы 3 впервые начинают обсуждаться белковые комплексы Ras-GAP. Однако эти трехбуквенные обозначения никак не расшифровываются или хотя бы разъясняются. Аналогичные примеры есть и в других разделах диссертации. Хотя встречаются случаи, как, например, в предложении " Вместе с тем, они дают информацию, характеризующую фермент" на стр. 97, где автор уже не прибегает к экономии слов.

Энергетическая диаграмма на рис. 3.10 выражает несколько удивительный результат, что основной барьер ферментативной реакции гидролиза ГТФ в ферментативном комплексе, включающем белок ускоритель, связан не с целевой реакцией отщепления фосфат иона, а реализуется на стадии регенерации исходного состояния фермента. Так как в отсутствие белка ускорителя скорость гидролиза ГТФ падает на 4 порядка, то было бы уместно привести соотношение энергетических барьеров собственно реакции гидролиза и стадии регенерации в этом случае.

#### Рекомендации по использованию результатов диссертации:

Полученные результаты могут быть использованы для создания ингибиторов ферментов человека, новых фоторецепторных систем и фундаментального изучения биологических макромолекул в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова, Институте проблем химической физики РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН, Институте биоорганической химии РАН, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

#### Заключение:

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа Хреновой М.Г. «Интерпретация и прогнозирование свойств белковых систем методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования» представляет собой обширное

законченное научное исследование, выполненное по актуальной тематике на высоком теоретическом уровне. В диссертационной работе Хреновой М.Г. успешно решена проблема интерпретации экспериментальных данных и прогнозирования свойств белковых систем с требуемой для опытной проверки точностью на основании расчетов современными методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования, включая методы квантовой химии, комбинированный метод квантовой механики / молекулярной механики и метод молекулярной динамики.. Достоверность результатов обеспечена использованием современных методов молекулярного моделирования, сравнением полученных результатов с экспериментальными данными и успешной экспериментальной проверкой сделанных прогнозов. Автором проведено глубокое исследование механизмов ферментативных реакций и фотохимических процессов в белковых системах и разработанные подходы являются существенным вкладом в развитие предсказательных методов молекулярного моделирования биологических систем. Сделанные выводы для конкретных систем обладают существенной новизной и имеют несомненную практическую значимость. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации, выводы и заключения обоснованы. Работа отвечает всем требованиям ВАК, включая п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» в редакции постановления правительства Российской Федерации № 842 от 21.04.2016 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора физико-математических наук, а её автор, Хренова Мария Григорьевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 02.00.17 – математическая и квантовая химия.

Диссертационная работа обсуждена и одобрена на семинаре Отдела кинетики и катализа Института проблем химической физики РАН, состоявшемся 19 октября 2016 года под председательством д.ф.-м.н. профессора Куликова А.В. с участием 9 докторов и 13 кандидатов наук (протокол № 2 от 19 октября 2016).

Заведующий отделом кинетики и катализа,  
д.х.н., профессор  
(специальность 02.00.04 физическая химия)

  
Шестаков Александр Федорович

Подпись профессора А.Ф. Шестакова  
**ЗАВЕРЯЮ**  
Ученый секретарь ИХФ РАН  
Доктор химических наук



  
Б.Л.Психа

142432 г. Черноголовка Моск.обл.,  
Пр. ак. Семенова, 1, ИХФ РАН.  
Тел. (496)522 5163; e-mail a.s@icp.ac.ru