

ОТЗЫВ

официального оппонента
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

Актуальность темы. Развитие методов молекулярного моделирования, а также суперкомпьютерных технологий открывает возможности не только для интерпретации существующих экспериментальных данных, но и для предсказания свойств новых систем, в частности, белковых, которые и рассматриваются в данной работе. Основным методом, который диссертант использует в своей работе – комбинированный метод квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ), предполагающий описание наиболее важной части системы методами квантовой химии для описания актов образования и разрыва химических связей, а также различных электронных состояний. В рамках выбранных подходов суперкомпьютерного молекулярного моделирования автор диссертации решает актуальную задачу – разрабатывает модели, способные интерпретировать экспериментальные данные и прогнозировать свойства белковых систем с требуемой для опытной проверки точностью; при этом круг рассматриваемых объектов очень разнообразен и включает в себя ферментативные и фоторецепторные системы.

Структура работы и основные результаты. Диссертация состоит из введения, 5 глав, основных результатов и выводов и списка цитируемой литературы из 285 наименований, 138 рисунков и 25 таблиц и изложена на 243 страницах машинописного текста.

Во Введении четко обоснована актуальность выбранной темы; описываются рассматриваемые объекты, фоторецепторные и ферментативные системы, и применяемые методы моделирования, включая комбинированный метод квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ), методы квантовой химии и метод молекулярной динамики, как с классическими, так и с КМ/ММ потенциалами. Кроме этого, здесь же приведены степень научной новизны и практическая значимость результатов и личный вклад автора.

В первой главе обсуждаются современные методы молекулярного моделирования, применяемые для изучения белковых систем, а также роль суперкомпьютеров в развитии и применении этих методов, при этом критически оцениваются границы их применимости. Далее представлены примеры конкретных расчетов выбранными методами: механизм ферментативной реакции гидролиза пенициллина пенициллинацилазой методом КМ/ММ, а также молекулярно-динамическое моделирование бактериального фотосинтетического центра. Каждая из последующих глав содержит решенную задачу для выбранной белковой системы, включающую интерпретацию существующих экспериментальных данных и предсказание свойств новых систем на основе построенных моделей.

Вторая глава посвящена матричной металлопротеиназе-2 (ММП-2), ферменту человека, поддерживающему постоянство состава внеклеточного матрикса. В рамках диссертационной работы решалась фундаментальная задача, связанная с изучением механизма протеолиза в активном центре этого фермента и прикладная задача поиска ингибиторов этого фермента. Поскольку изучаемый фермент содержит катион цинка в активном центре, большое внимание уделялось выбору протокола расчета, а именно подбору функционала в методе функционала электронной плотности и базисного набора. В работе сформулирован важный методический вывод о применимости рассматриваемых методов к выбранному типу системы,

включающей двухзарядный катион металла. Поскольку субстрат в данной системе находится на поверхности белка, автор уделяет особое внимание учету его конформационной подвижности и правильному подсчету вкладов в свободную энергию. Также рассмотрен механизм гидролиза в мутантной форме с заменой каталитической глутаминовой кислоты на аспарагиновую и показано, что в нативном ферменте лимитирующей является стадия выхода продукта, а в мутантной форме химическая стадия и выход продуктов сопоставимы по скоростям. На основе полученного механизма реакции сделаны выводы о ключевых участниках процесса и предложены олигопептиды и их миметики, являющиеся, по данным расчетов, ингибиторами MMP-2. Такие соединения синтезированы и охарактеризованы экспериментально в Институте биохимии им. А.Н. Баха, что подтвердило прогнозы, сделанные по результатам расчетов.

В третьей главе представлены результаты моделирования реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ) комплексами малых ГТФаз с белками-ускорителями. Получен полный механизм превращений в активном центре ферментативного комплекса Ras-GAP, включающий разрыв связи фосфор-кислород и регенерацию фермента в исходное состояние. За счет численного решения системы дифференциальных кинетических уравнений автору диссертации удалось получить эффективное значение константы скорости расходования ГТФ, что напрямую было сопоставлено с экспериментальными данными по кинетике единичного каталитического цикла и показало количественное согласие расчетов с экспериментом. Также получен механизм реакции для родственного комплекса Arl3-RP2 и обнаружено наличие относительно стабильных интермедиатов реакции. Колебательный анализ фермент-субстратного комплекса, заселенных интермедиатов и комплекса фермент-продукты показывает наличие характеристических мод, экспериментальное измерение которых может подтвердить предложенный механизм.

В четвертой главе рассматриваются результаты, полученные для фоторецепторных систем с флавином в качестве хромофорной группы. В работе полностью охарактеризован фотоцикл BLUF доменов – бактериальных рецепторов синего света. Показано, что как в фотореакции, так и в регенерации рецепторного состояния основную роль играют консервативные остатки тирозина и глутамина. Также изучены фотофизические свойства флуоресцентного белка на основе флавина iLOV и дан прогноз по его модификации для смещения спектров поглощения и флуоресценции в красную область.

В пятой главе обсуждаются результаты, полученные для GFP-подобных и родственных им флуоресцентных белков и хромопротеинов, а также сенсоров на их основе, работающих за счет резонансно-индуктивного переноса энергии (FRET). В качестве наиболее значимого результата в этой части работы стоит выделить теоретическую разработку и успешную экспериментальную проверку нового FRET-сенсора на каспазу-3, обладающего улучшенными характеристиками.

Результаты работы опубликованы в 33 статьях в рецензируемых научных журналах и 2 статьях в тематических научных сборниках, что свидетельствует о большом объеме полученных данных. Полученные результаты могут быть рекомендованы к использованию в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Институте проблем химической физики РАН, МГУ имени М.В. Ломоносова, Институте биоорганической химии РАН, Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН.

Выводы диссертации научно обоснованы, имеют существенное практическое значение, поскольку относятся к актуальным биологическим объектам. Исследования Хреновой М.Г. позволили получить ряд новых данных по интерпретации свойств существующих систем, а также предсказать новые системы с заданными свойствами, часть из которых была

проверена экспериментально. Достоверность результатов Хреновой М.Г. определяется современным уровнем проведенных теоретических исследований, а также предсказательной силой полученных данных. Естественно, что такая большая работа не может быть свободна от недостатков.

Отметим некоторые из них:

1. Для белкового комплекса Ras-GAP существует множество гипотез и расчетных данных относительно механизма разрыва связи P-O (ассоциативный, диссоциативный, концертный). В литературной части этой главы не уделяется должного внимания этому вопросу. Также не понятно, к какому типу механизма относятся данные, полученные автором.
2. Почему для двух схожих систем Ras-GAP и Arl3-RP2 при сравнении с экспериментом сильно различаются ошибки в рассчитанных значениях эффективной константы скорости реакции.
3. Экспериментальные исследования, инициированные по результатам расчетов, и их результаты представлены очень лаконично. Хотелось бы видеть больше информации о проведенных экспериментах.
4. КМ/ММ расчеты реакции гидролиза модельного олигопептида в активном центре MMP-2 проводились с использованием силового поля OPLS-AA для описания ММ части системы. Однако нигде более в диссертации это полноатомное силовое поле для МД расчётов не упоминается и не рассматривается, хотя относится к одному из самых используемых силовых полей при расчётах биосистем. Хотелось бы выяснить - почему именно не рассматривалось это силовое поле и возможно ли развитие методов, предложенных диссертантом, в отношении него?
5. В работе подробно рассматривается моделирование ионов кальция и цинка, однако недостаточно подробно рассмотрена роль ионов магния. Так, например, при описании гидролиза гуанозинтрифосфата кратко упоминается, что магний теряет свою координационную сферу, возможно, из-за малого

количества молекул воды, но не ясно, проводилась ли какая-то проверка этой гипотезы?

6. Интерес вызывает раздел, посвящённый квантовым расчётам флавина - спектров поглощения и флуоресценции в рамках многоконфигурационного метода самосогласованного поля в газовой фазе и растворе. В работе исследуется система, содержащая 5 молекул воды; изучались ли параллельно системы, содержащие большее или меньшее количество воды? Не сказывается ли количество воды на выводах о смещении полос поглощения и испускания?

7. Небольшое замечание также касается рисунка 4.29 - на нём не приведена нумерация атомов флавина, что затрудняет понимание результатов.

Приведенные замечания никоим образом не умаляют достоинств этой интересной и содержательной диссертации.

Заключение. Диссертационная работа Хреновой М.Г. «Интерпретация и прогнозирование свойств белковых систем методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования» является фундаментальным исследованием, имеющим также прикладное значение. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации, выводы и заключение научно обоснованы. Высокий теоретический уровень работы определяется применением современных методов молекулярного моделирования. Следует особо отметить широту исследований – в работе изучаются фотохимические процессы, ферментативный катализ и конформационная динамика белков, а также тщательное сравнение получаемых результатов с экспериментальными данными. Работа отвечает всем требованиям ВАК РФ, включая п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 года в редакции от 21.04.2016 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор – Хренова Мария Григорьевна – заслуживает

присуждения ей степени доктора физико-математических наук по специальности 02.00.17 – математическая и квантовая химия

21.10.2016 г.

доктор физико-математических наук (01.04.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества), заместитель директора по научной работе

ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН



Крупянский Юрий Федорович

Адрес:

ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
отдел строения вещества, лаборатория динамики биополимеров
119991 Москва, ул. Косыгина 4

Тел: +74959397300, факс: +74956512191

E-mail: yufk@chph.ras.ru

Адрес в Интернете: <http://www.chph.ras.ru/>