



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

29.08.2016 № 401/1-217.1-664

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биологической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

академик В.Т. ИВАНОВ

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Макарова Геннадия Ивановича
«Молекулярно-динамическое исследование рибосомного туннеля и его комплексов с
антибиотиками», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Понимание на молекулярном уровне специфических особенностей структурной организации, динамического поведения и, следовательно, механизмов функционирования рибосом и их отдельных элементов, является чрезвычайно важной задачей - как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. В первом случае ее решение позволит ответить на вопрос, как именно осуществляется синтез белков на рибосоме. Во втором – направленно воздействовать на характеристики этого процесса, а также разработать химические соединения, селективно ингибирующие работу бактериальных рибосом и, следовательно, являющиеся новыми перспективными антибиотиками. Несмотря на обилие накопленных экспериментальных данных о различных биохимических аспектах работы рибосом и, более того, об их пространственной структуре, ряд важнейших атомистических деталей указанных процессов по-прежнему остается не исследованным. В частности, непонятны молекулярные основы устойчивости рибосом к антибиотикам. Поскольку одной из мишеней действия последних является т.н. «рибосомный туннель» (РТ), изучение структурно-динамических аспектов поведения РТ и взаимодействие его компонентов с различными классами антимикробных агентов представляет актуальную научную проблему. Решению этих задач с помощью методов молекулярного компьютерного моделирования и

посвящена работа Макарова Г.И., что определяет значимость и актуальность темы диссертации

Диссертация изложена на 158 страницах и включает: Список сокращений, Введение (Глава 1), Обзор литературы (Глава 2), описание результатов и их обсуждение (Глава 3), Раздел «Методы» (Глава 4), Выводы (Глава 5), Список литературы из 232 источников. Диссертация содержит 48 рисунков и 6 таблиц.

Во Введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования. Глава 2 представляет собой литературный обзор, включающий 3 раздела, которые затрагивают следующие основные тематики: 1) Строение рибосомы и рибосомного туннеля (раздел 2.1); 2) Метод молекулярной динамики (раздел 2.2); 3) Исследование рибосомы методом молекулярной динамики (раздел 2.3). Из обзора литературы следует, что выбранная автором область исследования развивается быстрыми темпами, накоплен большой объем информации, которая может быть использована при планировании вычислительных экспериментов и анализе получаемых результатов. Так, в разделе 2.1 приведены современные биохимические и структурные данные о пространственной организации рибосомы, рассмотрены этапы ее работы при синтезе полипептидной цепи, детально описаны события, происходящие в рибосомном туннеле (РТ), в том числе – связывание с ним антибиотиков. Представленный критический обзор литературных источников дает основание автору сделать вывод о необходимости проведения атомистических расчетов молекулярной динамики (МД) РТ с целью анализа его структурно-динамических характеристик, которые, в свою очередь, необходимы для понимания механизма функционирования РТ и дизайна новых молекул, способных эффективно действовать на него. Следующий раздел (2.2) посвящен изложению основ метода МД, причем в первой части (2.2.1) приведены стандартные сведения, которые легко можно найти в многочисленных учебниках по данной тематике. Тем не менее, эта информация будет полезна студентам и новичкам, пока не знакомым с МД-технологиями. Следующий подраздел (2.2.2), на мой взгляд, более информативен, т.к. в нем обсуждаются некоторые специальные возможности современной МД, которые не так широко описаны в учебниках. Среди них – методы, позволяющие повысить эффективность исследования конфигурационного фазового пространства молекулярных систем, а также вычислительные подходы к количественной оценке их свободной энергии. Заключительный раздел Обзора (2.3) рассказывает о компьютерном моделировании рибосом и их компонентов с помощью методов МД. Представленный материал непосредственно связан с темой работы, содержит свежую (вплоть до источников 2016 года) информацию о предложенных молекулярных моделях рибосом различного уровня сложности, об исследованиях процессов распознавания тРНК, транслокации, связывания антибиотиков и т.д. На мой взгляд, эта информация заслуживает

опубликования в виде отдельной обзорной статьи, она будет полезна как начинающим исследователям, так и специалистам в данной области.

Изложенный в обзоре литературы материал подводит читателя к логически обоснованным выводам относительно целей диссертационной работы и к формулировке конкретных задач, которые необходимо решить. Описанию полученных результатов и их обсуждению посвящена Глава 3 диссертационной работы Макарова Г.И.

Представленные научные результаты разбиты на пять разделов, причем каждый из них описывает либо данные МД-моделирования по связыванию конкретных антибиотиков и их производных с РТ (разделы 3.1, 3.4, 3.5), либо анализ молекулярных механизмов работы РТ, обуславливающих передачу аллостерических сигналов в этой части рибосомы (раздел 3.2) и определяющих устойчивость бактериальной рибосомы к антибиотикам (раздел 3.3). Важно отметить, что целый ряд вычислительных МД-экспериментов был проведен автором с целью рационализации и интерпретации полученных ранее в лаборатории с его участием экспериментальных данных. В частности, расчеты поведения тилозина в РТ помогли установить детальную картину межмолекулярных взаимодействий в туннеле, проанализировать динамику тилозина и его способность образовывать химические связи с окружающими группами РТ. Интересные новые результаты изложены автором в разделе 3.2. Они касаются детектируемых конформационных переходов в системе, представляющей собой центральный фрагмент большой субъединицы рибосомы *E. coli*, включающий весь пептидилтрансферазный центр и РТ. Цель расчета МД такой сложной системы заключалась в выявлении согласованных (коллективных) движений на этом участке рибосомы. Наличие подобных явлений позволяет выдвинуть предположение об аллостерической передаче сигналов в рибосоме. На основании результатов большого числа (21) запусков МД и последующей кластеризации накопленных конформационных состояний системы такие переходы были автором зафиксированы. Более того, было сделано предположение о ведущей роли гидрофобных и стэкинг взаимодействий в этих процессах, а также идентифицированы ключевые нуклеотидные остатки 23S рРНК рибосомы. Проанализировав всю совокупность данных МД, автор сформулировал гипотетический механизм, описывающий аллостерическую передачу сигнала в рибосоме на большие расстояния. Дальнейшие исследования покажут, насколько оправданным является это предположение.

Еще одной важной проблемой, рассмотренной в работе Макарова Г.И., является изучение механизма устойчивости бактериальной рибосомы к антибиотикам, вызываемой 2,8-диметилированием остатка A2503. Для решения этой задачи были проведены расчеты МД комплексов клиндамицина, линезолида, хлорамфеникола и эритромицина с большой субъединицей рибосомы *E. coli*, содержащей как моно-, так и ди-метилированные нуклеотиды.

В качестве контроля была использована система «дикого типа». В результате большой вычислительной работы (14 траекторий МД протяженностью от 160 до 400 нс) и тщательного анализа картины межмолекулярных взаимодействий в системах Макаров Г.И. сделал вывод о ключевой роли нуклеотидных остатков A2058, A2059, A2503 и G2061 в связывании антибиотиков. Наконец, в разделах 3.4 и 3.5 предложены молекулярные модели связывания альдегидных производных эритромицина и аминокислотных производных 5-О-микаминозилтилонолида (ОМТ) с бактериальной рибосомой. Проведение этих расчетов также было вызвано необходимостью интерпретировать имеющиеся в лаборатории, где работает автор, экспериментальные данные. Сравнивая картины водородных связей соответствующих соединений в комплексах, а также учитывая координированные ионы магния, автор предложил молекулярные модели комплексов рассматриваемых соединений с рибосомой. На основании этих результатов был проведен анализ свойств «структура-активность», которые позволили объяснить разницу в действии производных эритромицина и ОМТ на бактериальную рибосому.

Считаю, что цель и задачи, сформулированные в работе, достигнуты в ходе её выполнения. Автором самостоятельно получены и описаны оригинальные результаты, которые были доложены на российских и международных специализированных научных встречах. Выводы и заключения, представленные в работе Макарова Г.И., логически обоснованы и убедительно показывают новизну и применимость полученных результатов.

По материалам диссертации считаю необходимым сформулировать ряд вопросов и замечаний.

1. Методические аспекты, связанные с постановкой и реализацией вычислительных экспериментов, описаны крайне лаконично (всего 6 страниц), без важных деталей, которые необходимы, чтобы оценить адекватность и надежность полученных результатов. Кроме того, эта информация нужна для самостоятельного воспроизведения (при необходимости) расчетов заинтересованными исследователями. Автор, по-видимому, рассчитывает на то, что, ссылка на сайт, где размещена часть использованных компьютерных программ, делает описание таких технических подробностей излишним. Позволю себе с этим не согласиться. Во-первых, разбираться в программном коде не входит в задачу Читателя и Рецензента (если, конечно, они не хотят воспользоваться им!). Во-вторых, общую блок-схему расчетов (например, молекулярный состав моделируемых систем, число запусков МД и преследуемые в каждом случае цели, анализ воспроизводимости результатов и пр.) невозможно понять лишь на основе программных средств, выложенных в сети Интернет. В частности, не описан протокол управляемой МД и метадинамики, хотя применение данных методов таит в себе целый ряд

особенностей, которые могут серьезно повлиять на результат. На мой взгляд, Раздел «Методы» (Глава 4) должен содержать всю указанную информацию, включая описание стратегии численного эксперимента – блок-схему, проверку работы алгоритмов, анализ погрешностей и устойчивости данных и т.д.

2. В ряде случаев (см., например, стр. 77, 102, 106, 116), сравнивая эффективность межмолекулярных взаимодействий, автор приводит соответствующие величины потенциальной энергии. Однако, поскольку эти значения получены в рамках силового поля для химически неэквивалентных соединений, корректно сопоставлять лишь величину относительной свободной энергии. Таких количественных оценок в работе не приведено.

3. Непонятно, зачем «вырезанную» из структуры рибосомы кубическую ячейку с гранью 7 нм затем сольватировали в заполненной водой кубической ячейке большего объема (с гранью 8,8 нм)? Ведь на краях первой из них (рис. 4.1) находятся соседние фрагменты рибосомы?

4. В ряде случаев автор утверждает, что МД-моделирование «отобразило экспериментально наблюдаемую устойчивость рибосомы» к конкретным антибиотикам (стр. 101), «позволяет объяснить наблюдаемое для них в эксперименте соотношение активностей» (стр. 125), «верно описывает динамическое поведение комплексов тилозина и его производных с бактериальной рибосомой» (стр. 135) и т.д. Вместе с тем, учитывая, что речь идет о моделировании достаточно искусственной системы (см. замечание 3) с наложенными сильными ограничениями (структуры лигандов просто совмещали в пространстве с гомологами в экспериментальных моделях и проводили короткую МД-релаксацию), на мой взгляд, можно лишь говорить о конкретных структурно-динамических характеристиках объектов (подвижность, межмолекулярные взаимодействия и пр.), в то время как многие молекулярные аспекты таких сложных биологических явлений как устойчивость рибосом и др. по-прежнему «остаются за кадром». Кроме того, желательно было бы использовать «отрицательный контроль» - выполнить расчеты сходных с антибиотиками по структуре молекул, которые не обладают антибактериальной активностью, хотя и могут связываться в тех же сайтах РТ.

5. На стр. 130 автор указывает, что «топологии модифицированных нуклеотидных остатков строились в силовом поле parm99sb [161], а топологии моделируемых антибиотиков в силовом поле GAFF [216]». Далее: «все расчеты проводили с использованием пакета GROMACS ... и силового поля parm99sb». Непонятно, в каком тогда силовом поле рассчитывали комплексы РТ с антибиотиками? Если речь идет о совместном применении двух силовых полей - parm99sb и GAFF, - то это некорректно, т.к. каждую эмпирическую функцию потенциальной энергии параметризуют и калибруют независимо, на своих наборах данных.

6. Автор правильно замечает, что «при изучении связывания малой молекулы нуклеиновой кислотой необходимо обращать внимание на координированные в сайте связывания ионы и на

их взаимодействие с малой молекулой, ибо без этого образ ее взаимодействий с мишенью будет неполон и оттого искажен» (стр. 119) (стилистика автора сохранена – *Е.Р.Г.*). Более того сходная мысль сформулирована в виде одного из основных четырех выводов работы (Вывод-2, стр. 135). Замечу, что эта информация не является новой. Вместе с тем, в диссертации практически нет анализа соответствующих данных о локализации катионов, корректности их расположения в исходной структуре РТ, динамической подвижности и пр. В Главе 4 автор лишь указывает, что размещение ионов было выполнено с помощью «скрипта, милостиво предоставленного» коллегой.

7. На Рис. 3.29 не указаны погрешности расположения точек на графике. Это не позволяет оценить, насколько справедливы выводы, сделанные автором на основании указанных данных.

8. Некоторые выводы работы, на мой взгляд, изложены не вполне конкретно (см. замечания выше насчет выводов 1 и 2).

К недостаткам работы относятся и некоторые погрешности оформления. Отмечу, что автор использует ряд неудачных, жаргонных и некорректных выражений, например: «аденозин торчит в сторону» (стр. 8), «энергия образования ... взаимодействий уходит на «закрытие» области малой субъединицы» (стр. 14), «энергии валентных связей и углов» (стр. 34), «радиус действия кулоновых сил» (стр. 37), «плотность ... подвергают быстрому преобразованию Фурье» (стр. 38), «развертывание конформационных и фазовых переходов» (стр. 41 и далее по тексту), «значения ... взаимодействий» (стр. 84), «высочайшая подвижность ... нуклеотидного остатка» (стр. 89), «дистанционные ограничения» (стр. 99), «будет упрочать взаимодействие» (стр. 102), «служит причиной тяготению гетероциклических оснований ... к повороту» (стр. 103), «наистабильнейшая связь» (стр. 106), «ослабление связности» (стр. 110), «стабильнейшая связь» (стр. 122) и др. В тексте диссертации автор использует выражение «нековалентные взаимодействия». Считаю, что более корректно говорить: «невалентные взаимодействия» (см., например, труды М.В. Волькенштейна и других основоположников области).


Вместе с тем, отмеченные недостатки не снижают высокой в целом оценки работы Макарова Г.И. Высказанные замечания носят рекомендательный характер и служат для того, чтобы подчеркнуть сложность поставленной задачи, которая была успешно решена автором. Работа выполнена на современном методическом уровне и содержит новые интересные научные данные. Полученные автором результаты, наряду с богатым справочным материалом, несомненно, будут полезны не только исследователям, занимающимся анализом взаимосвязей структура-стабильность в нуклеиновых кислотах и белках, но и специалистам в других областях – молекулярной биофизике, биоинформатике, медицинской химии. Подобные лаборатории и

группы существуют в ВУЗах и научно-исследовательских организациях – на ряде естественнонаучных факультетов МГУ им. М.В. Ломоносова, СПбГУ, НГУ и др., в Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и др.

Выносимые на защиту результаты опубликованы в виде одной статьи в реферируемом международном журнале (индексируется в библиографической базе данных Web of Science) и двух статей в профильном российском журнале (индексируется в Web of Science), докладывались на российских и международных научных конференциях. Отмечу, что в одной из опубликованных статей (в журнале «Биохимия») Макаров Г.И. является первым автором. Автореферат правильно отражает содержание диссертации. Диссертационная работа Макарова Г.И. была рассмотрена и отзыв обсужден на заседании межлабораторного семинара Отдела структурной биологии ИБХ РАН (Протокол № 1 от 17.08.2016 г.) Диссертация полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям и изложенным в п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. №723)", а ее автор, Макаров Геннадий Иванович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10– «биоорганическая химия».

Заведующий лабораторией моделирования биомолекулярных систем
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

доктор физико-математических наук,
профессор



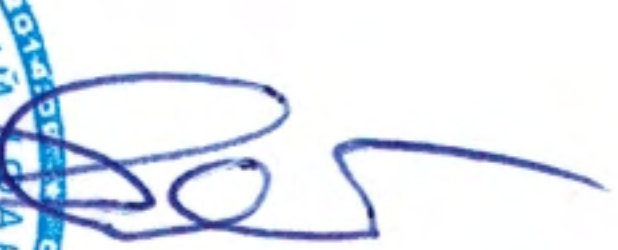
Р.Г. Ефремов

Адрес: ИБХ РАН, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997, Россия
Телефон: +7 495 330 58 74
Адрес электронной почты: r-efremov@yandex.ru

19 августа 2016 г.

Подпись проф. Р.Г. Ефремова подтверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН
д.ф.-м.н.



В.А. Олейников



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

07.09.2016 № 401/4-16.1-665

Председателю
Диссертационного совета Д 501.001.41
при Московском государственном
университете им. М.В. Ломоносова

академику А.А. Богданову

от проф. Р.Г. Ефремова

На Ваш запрос от 1 июля 2016 года

В связи с защитой кандидатской диссертации Г.И. Макаровым на тему «Молекулярно-динамическое исследование рибосомного туннеля и его комплексов с антибиотиками», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия», **СОГЛАСЕН** на включение в аттестационное дело и на дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых на основании нормативных документов Правительства, Минобрнауки и ВАК, на размещение их в том числе в сети Интернет, на сайте ВАК, в единой информационной системе.

Заведующий лабораторией моделирования биомолекулярных систем
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

доктор физико-математических наук,
профессор



Р.Г. Ефремов

Сведения о ведущей организации

по диссертации Макарова Геннадия Ивановича

«Молекулярно-динамическое исследование рибосомного туннеля и его комплексов с антибиотиками», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии Наук»
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ИБХ РАН
Ведомственная принадлежность	Федеральное агентство научных организаций
Место нахождения	г. Москва
Почтовый индекс, адрес организации	117997, Россия, г. Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.
Адрес электронной почты, адрес официального сайта в сети Интернет	office@ibch.ru , www.ibch.ru
Телефон	+7 (495) 335-01-00
Адрес электронной почты	office@ibch.ru
Список публикаций сотрудников ведущей организации по теме диссертации соискателя в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<ol style="list-style-type: none">1. Krylov N.A., Pentkovsky V.M., Efremov R.G. (2013). Nontrivial behavior of water in the vicinity and inside lipid bilayers as probed by molecular dynamics simulations. <i>ACS Nano</i> 7 (10), 9428-42;2. Volynsky P. E., Polyansky A. A., Fakhrutdinova G. N., Bocharov E. V., Efremov R. G. (2013) Role of dimerization efficiency of transmembrane domains in activation of fibroblast growth factor receptor 3. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 135, 8105-8108;3. Chugunov A.O., Koromyslova A.D., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Polyansky A.A., Pentkovsky V.M., Vassilevski A.A., Grishin E.V., Efremov R.G. (2013) Modular Organization of α-Toxins from Scorpion Venom Mirrors Domain Structure of Their Targets — Sodium Channels. <i>J. Biol. Chem.</i> 288, 19014–19027;4. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G. (2012) Multistate organization of transmembrane helical protein dimers governed by the host membrane. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 134, 14390-143400;5. Polyansky A.A., Ramaswamy R., Volynsky P.E., Sbalzarini I.F., Marrink S.J., Efremov R.G. (2010) Antimicrobial peptides induce the growth of nascent phosphatidylglycerol domains in a model bacterial membrane. <i>J. Phys. Chem. Lett.</i>, 1, 3108–3111.6. Koromyslova A.D., Chugunov A.O., Efremov R.G. Deciphering Fine Molecular Details of Proteins' Structure

and Function with a Protein Surface Topography (PST) Method (2014) *J. Chem. Inf. Mod.* **54**, 1189-1199.

7. Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., Boldyrev I.A., Efremov R.G. Liquid but Durable: Molecular Dynamics Simulations Explain the Unique Properties of Archaeal-Like Membranes. (2014). *Scientific Reports* **4**, 7462.

8. Kuznetsov A.S., Polyansky A.A., Fleck M., Volynsky P.E., Efremov R.G. The Adaptable Lipid Matrix Promotes Protein-Protein Association In Membranes. (2015) *J. Chem. Theory & Comput.* **11**, 4415–4426.

«Верно»

Заместитель директора ИБХ РАН,
Заведующий лабораторией
моделирования биомолекулярных систем –
доктор физико-математических наук,
профессор

«19» августа 2016 года.

М.П.



Ефремов Роман Гербертович