

## 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.** Современный уровень молекулярного моделирования и суперкомпьютерных технологий позволяет, в принципе, приступить к прогнозированию и объяснению природы свойств белковых макромолекул и процессов, протекающих в этих системах. Особую роль при этом играет комбинированный метод квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ). В рамках этого подхода активный центр фермента или хромофор-содержащая область фоторецепторного белка (кластер, содержащий от 100 до 200 атомов) описываются уравнениями квантовой химии, а остальная часть макромолекулы, состоящая из тысяч атомов, – с помощью классического метода силового поля. Для КМ-подсистемы уже реально применение достаточно точных вычислительных методов, обеспечивающих количественное воспроизведение энергетических профилей реакций в белках в основном и в возбужденном электронных состояниях. При этом решение уравнений разного вида, описывающих поведение белковых макромолекул с необходимой точностью, за разумное время, может быть выполнено только с использованием параллельных компьютерных алгоритмов и суперкомпьютеров. Кроме того, при молекулярно-динамическом моделировании биосистем для расчетов энергий и сил при анализе траекторий частиц и поверхности свободной энергии начинают использовать потенциалы КМ/ММ. Новые возможности вплотную подвели научное сообщество к необходимости выбора надежных протоколов расчета, способных описывать экспериментальные данные для рассматриваемых объектов и прогнозировать свойства новых белковых систем с требуемой точностью. Работа М.Г. Хреновой посвящена решению этой актуальной задачи, а именно: разработке моделей и эффективных методов суперкомпьютерного молекулярного моделирования для интерпретации экспериментальных данных и прогнозирования свойств белковых систем с требуемой для опытной проверки точностью.

Диссертант сосредоточился в работе на поиске путей ингибирования ферментов на основе механизмов реакций ферментативного катализа, разработке перспективных вариантов фоторецепторных белков для использования в качестве биомаркеров и предсказании структур сложных белковых комплексов. Круг объектов исследования выбран по критерию важности и актуальности каждой конкретной задачи для биомедицинских и биотехнологических приложений. Рассмотрены также вопросы интерпретации современных экспериментальных данных о свойствах соответствующих белков и превращений в этих системах, которые пока далеки от полного понимания.

**Структура диссертации.** Диссертация построена традиционно и состоит из Введения, 5-ти глав, Основных результатов и выводов и списка цитируемой литературы из 285 наименований. Работа изложена на 243 страницах машинописного текста и включает 138 рисунков и 25 таблиц.

Во Введении обоснованы актуальность выбранной темы и выбор рассматриваемых объектов, каковыми являются фоторецепторные и ферментативные системы; охарактеризован круг применяемых методов, среди которых комбинированный метод квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ), методы квантовой химии и метод молекулярной динамики с классическими и с КМ/ММ потенциалами. Сформулированы также степень научной новизны и практическая значимость результатов. Указан личный вклад в работу автора в тех случаях, когда исследования выполнялись коллективно.

В 1-й главе рассмотрены современные методы молекулярного моделирования, применяемые для изучения белковых систем, а также роль суперкомпьютеров в развитии и применении этих методов. Особо проанализированы границы применимости методов молекулярного моделирования для описания круга рассматриваемых объектов.

Во 2-ой главе рассматриваются результаты моделирования каталитических свойств матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2). Выбранный фермент содержит катион цинка в активном центре, поэтому большое внимание уделяется методическим вопросам. В частности, показана неприменимость менее затратных с вычислительной точки зрения вариантов метода функционала электронной плотности DFTB или GGA. Проведен анализ влияния выбора начальной структуры и размера сольватной оболочки на получаемые результаты. Рассчитаны профили реакции на поверхности потенциальной энергии для гидролиза модельного субстрата нативной ММП-2 и её мутантной формой с заменой каталитической глутаминовой кислоты на аспарагиновую. Для первой стадии реакции рассчитаны профили свободной энергии и показана роль учета конформационно-динамических свойств белка. Оценена энергия выхода продукта реакции из активного центра. На основании установленного механизма реакции предложены ингибиторы матриксной металлопротеиназы на основе олигопептидов и их миметиков. Подчеркнем: некоторые из этих ингибиторов были синтезированы и успешно прошли экспериментальную проверку. Это одно из очень существенных достижений диссертанта.

В 3-ей главе рассматриваются комплексы малых ГТФаз с белками-ускорителями. Предложен полный механизм превращений в активном центре фермента, включающий разрыв связи фосфор-кислород и регенерацию фермента. Получен профиль реакции и рассчитаны константы скоростей элементарных стадий; составлена кинетическая схема. Полученные путем численного решения кинетические кривые напрямую сопоставлены с экспериментом. Определены ключевые стадии процесса; получено выражение для эффективной константы скорости. Сравнены механизмы реакций для двух родственных комплексов; это позволило определить роль аминокислотных остатков в активном центре фермента. Указано, что наличие относительно стабильных интермедиатов в реакции гид-

ролиза ГТФ комплексом Arl3-RP2 делает возможным их детектирование методом ИК-спектроскопии с временным разрешением и подтверждение таутомеризации глутамина в активном центре фермента.

В 4-ой главе представлены результаты моделирования фотореакций флавино-содержащих белков. Охарактеризован полный фотоцикл BLUF доменов. Показано, что в результате фотореакции происходит таутомеризация и поворот аминокислотного остатка глутамина активного центра. Регенерация рецепторного состояния происходит с участием консервативного остатка гистидина и приводит к образованию протонированной формы глутамина, участвующей в дальнейших превращениях. Для флуоресцентных белков на основе флавина интерпретированы наблюдаемые свойства и предложена новая мутантная форма белка со смещенными в красную область энергиями вертикальных переходов из основного в первое синглетное состояние и из первого синглетного в основное состояние.

В 5-ой главе приведены результаты изучения сенсоров, работающих на основе резонансно-индуктивного переноса энергии (FRET) и состоящих из GFP-подобных и родственных им флуоресцентных белков и хромопротеинов. Для FRET сенсора, состоящего из флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP, предложен новый вариант связующего олигопептида, приводящий к увеличению эффективности резонансно-индуктивного переноса энергии. Предложенная конструкция проверена экспериментально; показано, что новый сенсор обладает большим динамическим диапазоном по сравнению с исходным и известными в литературе аналогами. Рассмотрены также вопросы фотостабильности GFP-подобных белков и изомеризация хромофорной группы.

#### **Новизна и научная значимость.**

В диссертации получены новые важные результаты, а именно:

- Разработаны эффективные вычислительные протоколы для интерпретации и прогнозирования свойств белковых систем методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования
- Установлен механизм протеолиза в матриксной металлопротеиназе MMP-2; предложены ингибиторы на основе олигопептидов и их миметиков; исследован полный цикл реакции гидролиза ГТФ в комплексах Ras-GAP и Arl3-RP2; интерпретирована роль значимых точечных мутаций в белке Ras.
- Установлен механизм фотоцикла флавино-содержащих белков BLUF и iLOV; определено, что сдвиг максимума флуоресценции в красную область спектра обусловлен аминокислотной заменой в белке iLOV.
- Предложена аминокислотная последовательность в связующем пептиде FRET сенсора на каспазу-3, состоящего из флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP, значительно улучшающая его характеристики.

- В рамках построенной полноатомной трехмерной модели определены наиболее предпочтительные центры связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с фотосинтетическим центром LH1-RC бактерии *Thermochromatium tepidum*.

Следует отметить, что объем полученных в диссертации данных весьма значителен, о чем свидетельствует количество публикаций автора в ведущих отечественных и зарубежных изданиях – 25 статей в высокоимпактных научных журналах. На сентябрь 2016 г. научные результаты М.Г. Хреновой процитированы в мировой научной литературе 339 раз (h-индекс=9). Это, безусловно, показатель того, что работа выполнена на мировом научном уровне.

#### **Достоверность научных результатов.**

Выводы диссертации сомнений не вызывают. Они научно обоснованы, имеют существенное практическое значение, а их достоверность определяется современным уровнем проведенных теоретических исследований и экспериментально доказанной предсказательной способностью предложенных вычислительных протоколов.

Можно резюмировать, что диссертация М.Г. Хреновой представляет собой крупное научное достижение: в ней разработаны вычислительные технологии (вычислительные протоколы) для интерпретации и прогнозирования свойств белковых систем методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования, обладающие экспериментально доказанной предсказательной способностью.

Как любое большое и разностороннее исследование, **диссертация М.Г. Хреновой не лишена недостатков**. Отмечу следующие из них.

- 1) Вопросы выбора обменно-корреляционного функционала при расчете активных центров методом КМ освещены в диссертации скороговоркой. Этот важный вопрос заслуживает большего внимания, когда речь идет о вычислительных протоколах нового типа, направленных на предсказание свойств веществ.
- 2) Применение эмпирической поправки типа D3 по Гримме на дисперсионные взаимодействия при исследовании механизма реакции протеолиза в MMP-2 требует дополнительного обоснования. Известны случаи, когда введение этой поправки ухудшало структурные параметры рассчитываемых молекулярных систем.
- 3) Из текста диссертации остается непонятным, проводились ли дополнительные расчеты, подтверждающие, что найденные стационарные точки являются минимумами и седловыми точками на поверхности потенциальной энергии.
- 4) В тексте диссертации практически не рассматривается вопрос выбора КМ-части в КМ/ММ расчетах, способ описания границы КМ и ММ частей, если она проходит по ковалентной связи и влияния размера КМ-части на получаемые результаты.

Сделанные замечания не снижают достоинств работы.

**Рекомендации по использованию результатов диссертации:** полученные М.Г. Хреновой результаты могут быть использованы в практике научных исследований в Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Институте проблем химической физики РАН, Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова, Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, Институте биоорганической химии РАН, РХТУ им. Д.И. Менделеева.

**Заключение:** Диссертационная работа Хреновой М.Г. «Интерпретация и прогнозирование свойств белковых систем методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования» является фундаментальным исследованием и крупным научным достижением, имеющим как научное, так и практическое значение. Для работы характерна широта исследований – изучаются фотохимические процессы, ферментативный катализ и конформационная динамика белков. Высокий теоретический уровень работы определяется применением современных методов молекулярного моделирования. Проведено также тщательное сравнение получаемых результатов с экспериментальными данными. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации, выводы и заключение конкретны и научно обоснованы. Считаю, что работа Хреновой М.Г. отвечает всем требованиям ВАК РФ, включая п.9. «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

03.10.2016 г.

доктор физико-математических наук (01.04.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества), профессор, заведующий кафедрой ФГБОУВО Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева

Цирельсон Владимир Григорьевич

Адрес:

ФГБОУВО РХТУ им. Д.И. Менделеева,  
кафедра квантовой химии,  
12504 Москва, Миусская площадь, 9.  
Тел.: +7-499-9789584; факс: +7-495-6092964  
E-mail: [tsirel@muctr.ru](mailto:tsirel@muctr.ru)  
Домашняя интернет-страница: <http://quant.distant.ru>

