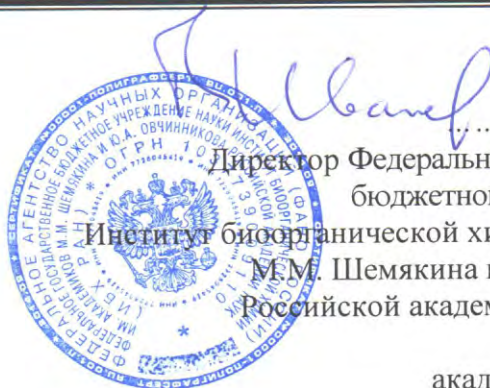




Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

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



«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 Медведева Кирилла Евгеньевича
«Компьютерное исследование влияния высокого давления и температуры на структуру и
функцию РНК-связывающего белка семейства Nip7 архей»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Понимание на молекулярном уровне специфических особенностей структурной организации, динамического поведения и, следовательно, механизмов функционирования белков организмов, обитающих в экстремальных условиях среды (например, при высоких температуре и давлении), является чрезвычайно важной задачей - как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. В первом случае ее решение позволит ответить на вопрос, насколько сильно отличаются указанные выше характеристики от аналогичных в белках организмов, живущих в нормальных, привычных нам, условиях. Очень интересно понять, связаны ли эти отличия (если они действительно существуют) с локальными изменениями структурно-динамических свойств белков или они носят глобальный характер. Установление подобных взаимосвязей структура-активность и, особенно, точечных сайтов регуляции (например, отдельных аминокислотных остатков) имеет важные перспективы для решения прикладных проблем – рационального создания молекул белков с заданными необычными свойствами, в частности, ферментов, способных работать при высоких значениях температуры и давления. Такие белки востребованы в различных биотехнологических и биомедицинских технологиях.

До недавнего времени рассмотренные выше задачи имели в основном умозрительный характер, т.к. не было накоплено достаточно информации о белках организмов-экстремофилов, в том числе имеющих высокую степень родства с белками организмов, обитающих в нормальных условиях. Вместе с тем, выявление тонких специфических особенностей работы белков из обеих групп возможно, видимо, лишь путем их детального сравнительного анализа. В последние годы необходимая информация стала доступной благодаря расшифровке геномов целого ряда организмов-экстремофилов, а также установлению пространственной структуры некоторых из кодируемых ими белков. Серьезным подспорьем экспериментальных методов структурной биологии в данном случае стала возможность применения мощных вычислительных подходов – молекулярного моделирования и биоинформатики. С их помощью, например, возможно изучить в атомистических расчетах поведение молекул гомологичных белков, относящихся к организмам с сильно отличающимися по физико-химическим параметрам условиями обитания. Решению этих задач и посвящена работа Медведева К.Е., что определяет значимость и актуальность темы диссертации

Диссертация изложена на 211 страницах и включает: Список сокращений, Введение, Обзор литературы (Глава 1), Раздел «Материалы и методы» (Глава 2), описание результатов и их обсуждение (Главы 3 и 4), Заключение, Выводы, Список цитируемой литературы из 245 источников, и 10 приложений. Диссертация содержит 23 рисунка и 6 таблиц.

Во Введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, описаны научная новизна и положения, выносимые на защиту, даны сведения об апробации работы. Помимо этого, во Введение входят разделы «Основные публикации» и «Структура и объем диссертации». Глава 1 представляет собой литературный обзор, включающий 11 подразделов, которые затрагивают три основные тематики: 1) Влияние высокого давления и температуры на живые организмы и способы изучения подобных эффектов с помощью методов молекулярного моделирования (разделы 1.1 – 1.5); 2) Характеристика объектов исследования – белка Nip7 из архей рода *Pyrococcus* и его гомологов (разделы 1.6 – 1.9); 3) Методы биоинформационного анализа аминокислотных последовательностей с целью выявления функционально важных остатков, потенциально отвечающих за адаптацию к условиям среды (разделы 1.10 - 1.11). 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, показано, что экстремальные условия обитания могут существенно влиять на молекулярные аспекты организации и функционирования белков. В частности, это относится к эффективности

межмолекулярных взаимодействий, включая эффекты гидратации. Обзор состояния дел в мире по данной тематике свидетельствует о наличии целого ряда нерешенных проблем и, следовательно, говорит о том, что рассматриваемая тема остается актуальной. Отмечу, что использованные автором литературные источники включают как классические работы, так и совсем свежие (включая 2012-2014 гг.) публикации, что повышает ценность диссертации как современного справочного издания. Изложенный в обзоре литературы материал подводит читателя к логически обоснованным выводам относительно целей диссертационной работы и к формулировке конкретных задач, которые необходимо решить.

Глава 2 («Материалы и методы») посвящена детальному описанию используемых автором объектов исследования - белка Nip7 из двух архей-экстремофилов рода *Pyrococcus*, методов построения моделей их пространственной структуры, вычислительных протоколов молекулярной динамики (МД) этих белков, а также способов анализа полученных траекторий МД. Кроме того, представлены биоинформационные подходы, использованные автором для поиска в семействах белков аминокислотных замен, специфичных для организмов-экстремофилов, а также описано примененное автором программное обеспечение. Материал изложен четко и дает подробное представление об использованных подходах. Технические детали Главы 2 позволяют заинтересованным исследователям самостоятельно воспроизвести вычисления, проделанные автором. Это крайне важно для специалистов, проводящих исследования по близким тематикам.

Представленные научные результаты разбиты на 11 разделов, причем 10 из них (Глава 3, разделы 3.1 – 3.10) посвящены результатам МД, а заключительный (Глава 4, раздел 4.1) – описывает данные по поиску мутаций, связанных с адаптацией белков Nip7 архей к экстремальным условиям обитания. По моему мнению, наиболее интересными результатами, описанными в Главе 3, являются данные об интегральной стабильности обеих моделей в широком диапазоне значений температуры и давления, хотя, как и следовало ожидать, при высоких температурах наблюдается увеличение локальных флуктуаций структуры на ряде участков. Кроме того, важной новой информацией является зарегистрированное автором снижение конформационной подвижности белка при высоком давлении. Ценным результатом также следует признать сделанный вывод о существенно различном динамическом поведении N- и C-терминальных доменов белка. Первый из них стабилизирован большим числом солевых мостов и является структурно жестким, а второй домен подвержен значительным флуктуациям в ходе МД, что, скорее всего, позволяет ему эффективно связывать РНК. Вместе с тем, и в менее лабильном N-концевом домене удалось выявить небольшой подвижный участок (остатки 49-58), который, по мнению автора, может быть вовлечен в белок-белковые взаимодействия. Отмечу, что некоторые из описанных выше эффектов зарегистрированы

впервые.

Выявленные в ходе молекулярно-динамических экспериментов локальные особенности структуры и динамики белков Nip7 обуславливают необходимость детального анализа консервативных/вариабельных свойств идентифицированных участков белков с различающимися свойствами – с целью установления аминокислотных остатков, замены которых могут быть важны для адаптации молекул к условиям окружения. Решение этой задачи рассматривается в Главе 4. Изучение аминокислотных последовательностей родственных белков из организмов, обитающих как при атмосферном, так и при высоком давлении, и, кроме того, при высоких и стандартных значениях температуры, позволили автору установить некоторые закономерности возникновения точечных мутаций, в результате которых значительно меняются физико-химические свойства соответствующих аминокислотных остатков. Так, было показано, что остатки на поверхности N-концевого домена белка Nip7 более полярны в случае глубоководных и термофильных организмов – по сравнению с мелководными. Кроме того, в первом случае N-концевой домен белка характеризуется более высокой стабильностью за счет большего числа солевых мостов. На основании полученных данных автор делает предположение о том, что указанные факторы играют важную роль в адаптации организмов-экстремофилов к внешним условиям, модулируя эффективность взаимодействий Nip7 с другими партнерами, например, с субъединицами экзосомы архей, которая отвечает за деградацию молекул РНК.

Считаю, что цель и задачи, сформулированные в работе, достигнуты в ходе её выполнения. Выводы и заключения, представленные автором, логически обоснованы и убедительно показывают новизну и применимость полученных результатов.

По материалам диссертации считаю необходимым сформулировать ряд вопросов и замечаний.

1. Расчеты МД были выполнены в широких диапазонах температуры (300-373 К) и давления (0,1-100 МПа) с использованием одного и того же силового поля amber99sb-ildn. Вместе с тем, эмпирические силовые поля параметризуют по экспериментальным данным, полученным на гораздо более узких интервалах значений температуры и давления. Поэтому вопрос о применимости стандартной функции потенциальной энергии и соответствующих параметров силового поля требует специального обоснования, калибровки и тестирования. В частности, это относится к «экстремальным» условиям высоких температур (до 100° С (!)) и давления (до 1000 атм. (!)). Однако автор совсем не обсуждает этот важный аспект моделирования.

2. Считаю, что Раздел 1.5.1 («Теоретические основы молекулярной динамики»), посвященный краткому описанию хорошо известных принципов метода МД, является лишним. На мой

взгляд, более целесообразно было бы посвятить часть литобзора более современным и проблематичным вопросам – например, особенностям вычислительных протоколов МД при высоких температурах и давлении (см. замечание 1 выше).

3. На стр. 55 обсуждается вопрос о том, является ли биологически значимой димерная структура белка Nip7, предложенная на основании данных рентгеноструктурного анализа. Учитывая, что «пространство (! – прим. Е.Р.Г.) между мономерами составляет порядка $700 \text{ \AA}^2$ поверхности доступной растворителю на молекулу или 8% от общей поверхности», автор предположил, что «димерная структура была образована в результате кристаллизации и не имеет биологической значимости» (авторская пунктуация сохранена – прим. Е.Р.Г.). Площадь контакта $700 \text{ \AA}^2$ вполне годится для формирования димера, поэтому для получения дополнительных аргументов можно было бы использовать существующие вычислительные методы идентификации потенциальных участков белок-белковых взаимодействий, например, основанных на анализе степени полярности/гидрофобности, методе Д. Айзенберга (D. Eisenberg) и др.

4. Непонятно, что имел в виду автор, утверждая, что «на основе анализа литературных данных ... <было> приведено теоретическое обоснование метода молекулярной динамики» (стр. 69)?

5. На стр. 108 автор резюмирует результаты, полученные для изучаемых белков методом МД при нормальном и высоком давлении. Основной итог: (1) «увеличение давления стабилизирует белковую глобулу, а также белковые комплексы, сформированные ферментами; (2) «такая стабилизация может возникнуть в результате снижения флуктуаций полипептидной цепи при высоких давлениях и температурах». Это – чересчур расплывчатые формулировки, которые не объясняют на молекулярном уровне механизмы повышения конформационной стабильности белка. Возможно, дополнительную информацию могли бы дать результаты анализа нормальных колебаний белков при различных значениях температуры и давления. Такие данные сейчас рутинным образом получают в молекулярно-динамических расчетах.

6. Предположения автора о функциональной роли ключевых, на его взгляд, аминокислотных замен, отличающих белки мелководных и глубоководных организмов (напр., стр. 128), было бы полезно подкрепить более детальными результатами МД, в частности - данными о стабильности локальной вторичной структуры, временах жизни и заселенности водородных связей, характером сольватации и т.д.

7. Результаты работы представляют собой два больших раздела – исследование поведения моделей белка Nip7 и его аналогов методом МД и анализ набора аминокислотных последовательностей соответствующих родственных белков с целью выявления специфичных остатков, потенциально определяющих поведение белков архей в условиях варьирующих

значений температуры и давления. Считаю, что оба блока результатов слабо связаны между собой общей дискуссией. Так, на стр. 130 автор заключает, что «все три перечисленные позиции (аминокислотных остатков – *прим. Е.Р.Г.*), в которых происходят замены, значимо влияют на изменение параметра RMSDL белка Nip7 двух моделей (Рисунок 16). Полученные результаты в целом согласуются с полученными нами ранее результатами о накоплении неполярных замен в белках мелководных организмов...». На мой взгляд, автору следовало бы более детально обсудить взаимосвязь между структурно-динамическими параметрами белков и характеристиками остатков в гомологичных последовательностях.

8. В отличие от детальной структурной информации о белках семейства Nip7, полученной методом МД, итоговый вывод о функциональной значимости этих данных (см. п. 5 Раздела «Выводы») является довольно расплывчатым. В частности, автор заключает, что различное число солевых мостов и степень гидрофобности поверхности, доступной растворителю, могут быть связаны с особенностями их (белков архей – *прим. Е.Р.Г.*) возможных взаимодействий с субъединицами экзосомы архей, которая отвечает за деградацию молекул РНК» (стр. 135-136). Вместе с тем, никаких конкретных доказательств этому нет.

К недостаткам работы относятся и некоторые погрешности оформления. Отмечу, что автор использует ряд неудачных, жаргонных и некорректных выражений, например: «оптимизация ДНК-полимераз ... в направлении термостабильности, специфичности и процессивности» (стр. 7), «организмы с различными оптимальными условиями температур и давлений» (стр. 7), «липидный бинарный слой» (стр. 21), «оставались стабильными во всех моделированиях» (стр. 21), «биомолекула превращается в систему шариков ... и пружинок» (стр. 37), «вращение вокруг двугранных углов» (стр. 39), «констант деформации валентных связей» (стр. 40), «электростатическая поверхность» (стр. 56), «РНК-связывающий кэп» (стр. 59), «минимизация системы» (стр. 73), «полученный анализ ... обрабатывался» (стр. 75), «высоко- и низкотемпературных траекторий» (стр. 85), «в мелководном белке» (стр. 115), «в мелководной выборке» (стр. 128), «в глубоководном белке» (стр. 129), «в мелководной и глубоководной группах последовательностей» (стр. 129), «у мелководной модели» (стр. 130), «повышенные частоты полярных остатков» (стр. 132). В тексте часто встречаются ошибки пунктуации.

Вместе с тем, отмеченные недостатки не снижают высокой в целом оценки работы Медведева К.Е. Высказанные замечания носят рекомендательный характер и служат для того, чтобы подчеркнуть сложность поставленной задачи, которая была успешно решена автором. Работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные, хорошо оформлена и легко читается. Полученные автором результаты, наряду с

богатым справочным материалом, несомненно, будут полезны не только исследователям, занимающимся анализом взаимосвязей структура-стабильность в 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 трех статей в профильных российских журналах (один из которых индексируется в Web of Science), докладывались на российских и международных научных конференциях. Отмечу, что в трех из опубликованных статей, включая работу в журнале BMC Structural Biology, Медведев К.Е. является первым автором. Автореферат правильно отражает содержание диссертации. Диссертационная работа Медведева К.Е. была рассмотрена и отзыв обсужден на заседании межлабораторного семинара Отдела структурной биологии ИБХ РАН (Протокол № 1 от 18.12.2014 г.) Диссертация полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым «Положением о порядке присуждения ученых степеней» к кандидатским диссертациям, а ее автор, Медведев Кирилл Евгеньевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

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 декабря 2014 г.

Подпись проф. Р.Г. Ефремова удостоверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН
д.ф.-м.н.



В.А. Олейников