

Отзыв официального оппонента
на диссертацию А. В. Попова
«Молекулярно-динамический анализ субстратной специфичности
8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз бактерий и человека»
представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 — Биохимия

Работа Попова Александра Викторовича посвящена проблеме определения структурных факторов, влияющих на активность 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз. Этот класс ферментов участвует в клеточной системе репарации повреждённой структуры ДНК, их основная роль в этой системе состоит в узнавании определённого класса повреждений ДНК и удалении повреждённых оснований.

Нарушение механизмов репарации ДНК может приводить серьёзным патологиям и предположительно является важным фактором, обуславливающим возникновение раковых заболеваний. В то же время существующие экспериментальные методы не позволяют в полной мере исследовать молекулярные механизмы, лежащие в основе системы репарации ДНК. Это обуславливает важность использованного в диссертационной работе подхода по применению методов молекулярного моделирования к исследованию специфичности ферментов этой клеточной системы.

Основные результаты диссертационной работы сформулированы в списке положений, выносимых на защиту, и отражены в структуре текста диссертации. В первой части результатов работы перечислены программные средства, которые использовались для обработки вычислительных экспериментов, проведённых с двумя белками из класса ДНК-гликозилаз. Вычислительные эксперименты проводились с использованием пакета программ моделирования методом молекулярной динамики BioPASED. Несмотря на то, что этот пакет программ используется в молекулярно-динамических экспериментах не так широко, как некоторые зарубежные пакеты, как, например, пакеты GROMACS и AMBER, преимуществами выбора этого пакета следует считать возможность непосредственных обсуждений и консультаций с разработчиками пакета, а также развитие опыта использования программ отечественной разработки. Следует подчеркнуть важность последнего из упомянутых преимуществ, поскольку разработка полноценного универсального пакета по молекулярной динамике предполагает высокий уровень квалификации в широком диапазоне современных информационных технологий применительно к задачам молекулярного моделирования. В первую очередь в этом ключе также следует оценить важность проведённой соискателем работы по написанию визуальных средств анализа траекторий молекулярной динамики. Большая часть пакетов по молекулярной динамике распространяется без графического интерфейса и без достаточно широкого набора средств обработки траекторий. Это представляет серьёзную проблему при использовании методов молекулярно-динамического моделирования, поскольку уровень квалификации в информационных технологиях, необходимый для полноценного использования этих методов, недостижим для большинства биологов, и, в свою очередь, только биологи в состоянии сформулировать задачу, где оказались бы эффективны исследования с помощью молекулярной динамики. Соискатель при этом продемонстрировал и глубокое владение методами биохимии и молекулярной биологии, и уровень владения информационными технологиями, достаточный для проведения вычислительных экспериментов с помощью метода молекулярной динамики. Таким образом, заявленный в положениях, выносимых на защиту, результат работы, состоящий в разработке пакета программ для обработки траекторий молекулярной динамики, безусловно, является значимым, поскольку допускает возможность распространения и использования разработанных инструментов среди других исследователей, без требования к ним о таком уровне владения информационными технологиями.

Как некоторое замечание или комментарий к проделанной работе в этой части, следует отметить, что современные тенденции при разработке свободного программного обеспечения, к которому относится и разработка соискателя, обычно предполагают модульность, расширяемость и универсальность разработки. В применении к разработке соискателя, это могло бы означать возможность обработки траекторий полученных с помощью других пакетов молекулярной динамики, таких как GROMACS или AMBER. Тестирование таких модулей не представляло бы затруднений, учитывая доступность этих пакетов. В то же время в диссертационной работе никак не обозначена возможность такого рода расширений.

Во второй части результатов работы приведены результаты моделирования структуры ДНК-гликозилазы *L. lactis*, обозначаемой в тексте как Frg. В результате проведённых вычислительных экспериментов получены результаты, касающиеся определения зарядовых состояний двух остатков в каталитическом центре фермента. Также исследована роль сети водородных связей между остатками белка, и молекул воды как потенциальных факторов при реакции катализа в активном центре фермента. Два молекулярных процесса, которые изучались в процессе вычислительного эксперимента — это протонирование двух аминокислотных остатков, участвующих в катализе, и аллостерическое влияние комплементарного основания на активность фермента при его взаимодействии с повреждённым основанием. Поскольку при моделировании траекторий в молекулярной динамике не предусмотрен расчёт химических изменений в системе, в том числе протонирования, то для изучения вопроса о протонировании двух остатков проводились расчёты четырёх траекторий, во всех вариантах зарядовых состояниях обоих остатков.

Для анализа траекторий использовался метод графического представления совместного распределения ключевых межатомных расстояний и/или углов в активном центре. Для такого расчёта использовалось ПО, разработанное соискателем. Построенные таким образом изображения позволяли явно обнаружить отличия между траекториями и характерные кластеры состояний системы в течении моделирования. Следует отметить, что и во второй, и в третьей частях работы корректно обсуждаются вопросы достоверности результатов моделирования на основании анализа среднеквадратичного отклонения траекторий и других методов интегральной оценки траекторий. Вывод о достаточной степени стабильности структур при моделировании следует признать обоснованным.

В рамках этой части диссертационной работы проводился также эксперимент *in vitro*, состоящий в измерении зависимости активности фермента от показателя кислотности, для выяснения влияния протонирования остатков в активном сайте на активность фермента. В измеренной зависимости был обнаружен единственный переход, что свидетельствует о влиянии состояния только одного остатка на процесс. Показатель рК для второго из остатков, рассчитанный с помощью алгоритма PROPKA на основе структур Frg из банка PDB, показал для него сравнимые с первым остатком критические показатели уровня кислотности. Однако, по предположению соискателя, подкреплённому результатами вычислительного эксперимента, зарядовые состояния второго остатка не лимитируют скорость реакции по причине возможности перехода между зарядовыми состояниями, причём переход возможно осуществляется с участием молекул воды присутствующих в активном сайте.

Для исследования влияния основания напротив повреждённого на активность фермента проводилось сравнение траекторий молекулярной динамики с разными основаниями, находящимися напротив повреждённого. Проводился анализ стабильности водородных связей в белке в сравниваемых траекториях. Положение устойчивых водородных связей позволяет проследить аллостерические эффекты, проявляющиеся при изменении основания напротив повреждённого. В частности, устойчивые водородные связи были обнаружены в домене цинкового пальца, который не относится непосредственно ни к активному сайту фермента, ни к участку белка, взаимодействующего с основанием ДНК напротив повреждённого.

В качестве комментариев к этой части работы, результаты по исследованию зарядовых состояний остатков могли бы быть дополнены расчётами с помощью алгоритма PROPKA и/или решения уравнения Пуассона-Больцмана для структур белка, полученных из траекторий молекулярной динамики, а не только структур из банка PDB. Также, несмотря на указанные в обсуждении методы недостатки моделирования с полностью явным заданием растворителя, такого рода моделирование могло бы дополнить изучение роли молекул воды в механизмах катализа, по сравнению с явным заданием только определённых молекул воды в области активного сайта.

Задача по поиску явного механизма аллостерического влияния основания напротив повреждённого на активность фермента безусловно может быть чрезвычайно сложной, так что некоторые зависимости, обнаруженные в структуре водородных связей, достаточны как результат, обозначающий этот механизм, в рамках объёма диссертационной работы. Однако следует рассмотреть эту сложную задачу в перспективе продолжения исследований, в том числе с помощью применения дополнительных средств для анализа траекторий молекулярной динамики. Также, в этом отношении, результаты работы, в которых обнаружены аллостерические эффекты в области цинкового пальца, отчасти пересекаются с результатами, полученными в нашей группе с помощью молекулярного моделирования, где также проявляется неожиданно важная роль сайтов связывания цинка в регуляции активности изучаемого нами фермента. И, наконец, как замечание к оформлению, в оформлении рисунка 13А, по-видимому, допущена ошибка в обозначении графиков RMSD, поскольку смысл комментария к этому рисунку в тексте противоположен смыслу самого рисунка.

Третья часть результатов диссертационной работы посвящена исследованию субстратной специфичности другого фермента из группы ДНК-гликозилаз, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека, обозначенного в тексте диссертации как OGG1. В этой части подробно рассмотрено сравнение экспериментальных результатов по измерению активности мутантных форм фермента и результатов компьютерного моделирования фермента с внесёнными аминокислотными заменами. Были исследованы три мутантных формы белка, а также белок без мутаций (WT). Поскольку объектом замены были аминокислотные остатки белка вблизи активного сайта, изучение эффекта вносимых мутаций позволяет прояснить механизм ферментативного катализа для этого белка.

Для сравнения траекторий молекулярно-динамического моделирования использовался метод графического представления распределения межатомных расстояний и углов, разработанный автором, использованный также в предыдущей части работы. В этой части использовалось трёхмерное представление распределения межатомных расстояний. Для представления выбирались ключевые межатомные расстояния в каталитическом центре белка, а также расстояния между атомами белка в каталитическом центре и атомами субстрата (повреждённого основания ДНК). Такой анализ позволил идентифицировать главное отличие динамических структур белка, влияющее на активность фермента и проявляющееся при внесении мутаций, в повороте каталитически важного остатка лизина в активном центре, так что неправильно развёрнутая боковая цепь этого остатка может являться причиной снижения активности. Также, по результатам описанного выше сравнения траекторий, был сделан обоснованный вывод, вынесенный в раздел положений, выносимых на защиту, о том, что внесение мутаций в большей степени влияет на пространственную конфигурацию активного сайта фермента, чем непосредственно на сам процесс взаимодействия фермента с субстратом.

В этой части работы также представлены результаты экспериментального измерения активности белка и его мутантных форм. Проведён анализ кинетики исследованной реакции. Результаты оценки кинетических параметров согласуются с выводами, полученными при анализе траекторий моделирования.

Для исследования специфичности фермента OGG1 к основанию напротив поверженного

также проводилось сравнение траекторий молекулярной динамики с моделями, содержащими различные основания напротив повреждённого. Использование апробированного в работе метода графического представления распределения межатомных расстояний, с учётом сделанных ранее выводов о ключевой роли поворота каталитически важного остатка лизина в активном сайте, позволило обнаружить проявление различия в траекториях сравниваемых моделей. А именно, снижение активности фермента в случае не комплементарного основания, находящегося напротив повреждённого, может быть объяснено аллостерическим эффектом, проявляющимся в некорректном развороте боковой цепи упомянутого остатка лизина, которое явным образом проявляется при сравнении траекторий.

В качестве комментариев к этой части работы можно отметить, что, несмотря на обнаруженный аллостерический эффект зависимости конформации активного сайта от изменения основания напротив повреждённого для белка OGG1, проявляющийся в развороте боковой цепи остатка Lys249, продолжение исследований в этом направлении могло бы включать подробное изучение динамических свойств молекулы белка, за счёт которых можно было бы объяснить наблюдаемый аллостерический эффект.

Упомянутые в рецензии замечания и комментарии к темам, исследованным в диссертационной работе, не ставят под сомнение высокий уровень работы, новизну полученных результатов и их практическую важность. Личный вклад соискателя в работу не вызывает сомнений, и содержание работы отражено в научных публикациях. Автореферат полноценно отражает содержание диссертации. По актуальности поставленных задач, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа, представленная соискателем Поповым Александром Викторовичем, полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, так как в работе изложены новые научно обоснованные разработки по применению технологий молекулярного моделирования, имеющие существенное значение для развития знаний об особенностях функционирования ферментов, участвующих в системе репарации повреждённой структуры ДНК, а ее автор, Попов Александр Викторович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Заведующий Лабораторией аналитической биоорганической химии
Лимнологического института СО РАН
доктор биологических наук, профессор

С. И. Беликов

Подпись С.И. Беликова заверяю:

Ученый секретарь Лимнологического института СО РАН

Н. В. Максимова

