

УТВЕРЖДАЮ

зам. директора ИТЭБ РАН,

доктор физ.-мат. наук, профессор



В.С. Акатов

«*22*» *ноября* 2021 г.

Отзыв

ведущей организации на диссертацию Изотовой Екатерины Дмитриевны «Роль структурных особенностей каталитического действия силикатеина- α в процессе биосилификации по данным компьютерного моделирования», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «биофизика»

Диссертационная работа Е.Д. Изотовой посвящена исследованию условий биосилификации живых организмов в процессе их естественной жизнедеятельности — процесса формирования кремниевых структур с заданными свойствами и формой. Поскольку биосилификация происходит в «мягких» условиях (в диапазоне нейтральных значений pH и низкой концентрации растворенных субстратов), а объемы перерабатываемого водными организмами исходного субстрата достигают 7 гигатонн биокремнезема в год, данный процесс является перспективным и наукоемким. Одними из немногих живых организмов, способных формировать кварцевоподобный экзоскелет (спикулу), являются животные — губки, тип *Porifera*. В представленных на сегодняшний день публикациях, посвященных процессу биосилификации у этих организмов, большое внимание ученых уделяется анализу структуры клеток и межклеточного пространства, в котором происходит зарождение и формирования спикулы. Также много исследований посвящены выделению, очистке и изучению кинетических параметров одного из основных ферментов биосилификации у *Porifera* силикатеина- α , принадлежащего семейству катепсиновых протеиназ. Однако молекулярным механизмам, лежащим в основе активации кремниевых кислот

(природных субстратов) с их последующей адгезией, уделяется недостаточное внимание. Таким образом, актуальность темы диссертации и ее соответствие специальности 1.5.2. «биофизика» не вызывает сомнения.

Постановка проблемы и ее актуальность.

Работа Изотовой Е.Д. посвящена поиску функционально значимых областей и конформаций активного центра силикатеина- α для инициации олигомеризации кремниевых кислот. Кремнийорганические соединения являются одним из базовых элементов в нанотехнологии. В последнее время особенно актуальными стали исследования взаимодействия кремния с биологическими молекулами. Это связано с тем, что полученные комплексы, как правило, могут сохранять основные функциональные особенности как кремния (высокая термостойкость, гидрофобность, и т.д.), так и биомолекул (возможность самосборки, специфической адсорбции и т.п.).

Структура диссертации.

Материалы диссертационного исследования изложены на 150 страницах машинописного текста, содержат разделы: Введение, Обзор литературы (Глава 1), описание объектов и методов исследования (Глава 2), изложение и обсуждение результатов (Главы 3 и 4), Заключение, Выводы, Список сокращений, Список литературы из 223 источников; в работе представлено 2 таблицы и 42 рисунка, а также Приложения А, Б и В. К сожалению, большое количество опечаток и несогласований в окончаниях слов снижают оценку качества работы.

Диссертация построена из нескольких логических разделов. Первый раздел посвящен изучению влияния степени протонирования и поворота имидазольного кольца His163, входящего в активный центр силикатеина- α , на геометрию, распределение зарядов и энергию связывания каталитической триады с модельным субстратом — ортокремниевой кислотой. Для избранных конфигураций построены поверхности перемещения протона H^+ вдоль донорно-акцепторной пары атомов комплекса фермент-субстрат. Эксперименты выполнены на полноатомном фрагменте белка силикатеина- α , включающем аминокислотные остатки активного центра (His163, Ser25, Gln19) и молекулу ортокремниевой кислоты $Si(OH)_4$. В диссертации показано, что πN имидазольного кольца His163 является более

электроотрицательным атомом, чем τN , вне зависимости от степени протонирования обоих азотов His163. Для состояний №2 и №6, из восьми рассмотренных конфигураций активного центра на поверхности потенциальной энергии переноса H^+ , характерно наличие двух энергетических минимумов вблизи электроотрицательных атомов. Эксперименты проведены с использованием метода теории функционала плотности с функционалом X3LYP в валентно-расщепленном базисе 6-31G(d)/6-311++G(2d, p) с использованием модели поляризационного континуума.

Вторая часть работы посвящена получению и описанию субстратного разнообразия кремниевых кислот в водном растворе (природными субстратами для силикатеина- α). В основе используемого подхода получения моделей олигомеров кремниевых кислот лежит метод молекулярной динамики. Реализованная молекулярная динамика использует силовое поле Feuston&Garofalini, позволяющее переопределять ковалентные связи между молекулами кремниевых кислот с элиминацией молекулы воды. Такой подход приводит к формированию кремниевых кислот с большим числом атомов кремния, что позволяет изучать процессы олигомеризации и пути формирования олигомеров на атомарном уровне. Полученные результаты обсуждаются как с позиции геометрической стабильности растущих олигомеров, так и с позиции графового разнообразия образующихся кремниевых кислот.

На следующем этапе полученные молекулярные структуры кремниевых кислот (Si_n , $n = 1-6$) оптимизируются с применением метода теории функционала плотности, используя функционал B3LYP и базис 6-311G. После этого полученные подготовленные структуры выступают в роли лигандов для выявления областей связывания кремниевых кислот с моделью силикатеина- α . Для осуществления данной задачи выбран метод молекулярного докинга с использованием сервисов BSP-SLIM и ROSIE. Проведенный докинг позволил идентифицировать три области взаимодействия кремниевых кислот с моделью силикатеина- α , вблизи Asp6, Thr94 и Ser25. Следует отметить, что регионом с большей аффинностью является область на поверхности фермента вблизи активного центра (Ser25 с максимумом -16,1 ккал/моль), которая для малых молекул кремниевых кислот разделяется на два

подрегиона. Для ряда олигомеров (Q^2_5 , $Q^2_3Q^3_2$ и $Q^1_2Q^2_4$) максимальная аффинность приходится на регион вблизи Thr329. Поскольку силикатеин- α обладает двумя функциями - ферментативной и структурообразующей, в диссертации уделено внимание взаимодействию двух идентичных субъединиц, а также проведена оценка перекрывания областей связывания белка с субстратами и регионами взаимодействия с идентичным белком для формирования фибрилл. По результатам экспериментов можно выделить два региона белок-белкового взаимодействия, не перекрывающихся с областями связывания с потенциальными субстратами.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Не подвергая ревизии интерпретацию и значимость полученных результатов, тем не менее, хочется высказать несколько пожеланий, которые могли бы усилить впечатление от представленной диссертации. Кремний обладает переменной валентностью от 1 до 4. Образование различных соединений кремния определяется большим числом внешних факторов (температура, pH, наличие заряженных групп или ионов и т.д.). Поэтому в настоящее время предпринимаются большие усилия по расчету физико-химических свойств и структуры таких соединений, в частности, силикатеина- α .

Для поиска функционально значимых областей и конформаций активного центра силикатеина- α Е.Д. Изотова использовала три основных вычислительных метода: метод молекулярной динамики, квантово-химические расчеты и метод молекулярного докинга. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Все результаты являются новыми и получены непосредственно соискателем.

Несомненно, сильной стороной является сочетание всех 3 указанных методов, они дополняют друг друга. Особенностью расчетов является использование реакционного силового поля Feuston and Garofalini (FG). Эта особенность одновременно является и сильной и слабой стороной расчетов. Однако разнообразные использованные в работе вычислительные имеют свою область применимости. Необходимо было обсудить – каким образом согласуются применяемые методы при решении данной задачи.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Полученное частотное разнообразие кремниевых кислот в водном растворе может быть использовано для разработки моделей идентификации кремниевых кислот в экспериментальных подходах. В работе получены низкочастотные олигомеры кремниевых кислот, ранее не идентифицированные экспериментальными методами. Полученные данные о влиянии степени протонирования, степени поворота имидазольного кольца His163, а также определенные области взаимодействия кремниевых кислот $Si_n = 1-6$ с поверхностью силикатеина- α вносят вклад в понимание основных закономерностей инициации ферментативного катализа силикатеина- α и формирования комплексов силикатеин-силикатеин.

Замечания.

Одной из слабых сторон работы является недостаточная верификация результатов расчета. Как правило, для исследования взаимодействия кремния с пептидами используются специальные силовые поля. Поэтому для верификации полученных результатов было бы желательно провести аналогичные расчеты с несколькими силовыми полями. Если такие расчеты невозможны, то следовало бы больше уделить внимания детальному сравнению полученных результатов с экспериментальными данными. В автореферате в нескольких местах указано, что полученные результаты качественно соответствуют эксперименту. Однако следовало бы создать отдельную таблицу соответствия полученных расчетных результатов с результатами, полученными в эксперименте.

Граничные условия для квантовых уравнений в химии важны, но в работе не указано, как их задать в живой клетке. Стоило бы этот вопрос обсудить.

Еще одно слабое место диссертации – не исследовано влияние pH. Для биофизических приложений чрезвычайно важно влияние pH. Все приведенные экспериментальные данные показывают существенное влияние этого фактора. Соискателю следовало бы, как минимум, обсудить, а лучше всего оценить влияние этого фактора на конформацию активного центра силикатеина- α и возможность получения оценки этого фактора в проведенных расчетах.

В работе встречаются опечатки, некоторые стилистические погрешности и частое

употребление англицизмов, например, «эквilibрация» вместо «уравновешивание» и «протонация» вместо «протонирование». Возможно, следовало бы сократить количество представленных в работе результатов, но с другой стороны, это лишило бы работу глубины и комплексности.

Кроме того, есть несколько замечаний к некоторым утверждениям в автореферате:

1. Раздел **2.1.2.** *Напечатано:* «**Оценка подвижности силикатеина- α в ходе МД.** Получено, что подвижность – полтора ангстрема...»

Замечание: Однако докинг проведен без учета этой подвижности! Докинг при отсутствии учета конформационной подвижности рецептора часто приводит к ошибочным результатам.

2. Раздел **2.1.3.** *Напечатано:* «**Характеристика стационарных состояний каталитической триады силикатеина- α с и без $\text{Si}(\text{OH})_4$** »

Замечание: Это необходимо, но вряд ли достаточно – каталитический акт не описывается стационарными состояниями.

3. Раздел **Научная новизна работы.** *Напечатано:* «В данной работе показано, что реакционное силовое поле Feuston and Garofalini (FG) адекватно воспроизводит ключевые геометрические параметры, при этом на долю IV координационного атома Si приходится ~98%.»

Замечание: ...геометрические параметры (*вопрос – чего?*) ... при этом на долю IV координационного атома Si приходится ~98% (*вопрос – чего?*)

4. Раздел **Научная новизна работы.** *Напечатано:* «Определены конфигурации каталитической триады силикатеина- α с минимальной энергией связывания с субстратом -32,82 ккал/моль и -26,78 ккал/моль».

Замечание: Эти значения превосходят типичные энергии денатурации растворимого белка и поэтому вряд ли реалистичны, как и другие подобные значения. Следовало бы упомянуть это и указать, что в работе используются лишь относительные, а не абсолютные значения рассчитанных энергий.

Указанные неточности и опечатки не оказывают существенного влияния на качество работы, значимость полученных результатов и не снижают их научной и практической ценности. Материалы диссертации опубликованы в пяти научных журналах из перечня ВАК РФ и представлены на Всероссийских и международных конференциях. Автореферат диссертации достаточно полно отражает ее

содержание. Диссертация представлена на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «биофизика», наиболее близким по содержанию работы являются разделы 1. «Молекулярная биофизика белка» и 3. «Биофизика сложных систем: математическая биофизика».

Заключение.

Диссертация «Роль структурных особенностей каталитического действия силикатеина- α в процессе биосилификации по данным компьютерного моделирования» является завершённым научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком научном и методологическом уровне. По актуальности, объёму выполненных исследований, научной новизне и научно-практической значимости удовлетворяет требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Изотова Екатерина Дмитриевна, заслуживает присуждения ей степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

Доклад Е.Д. Изотовой по материалам диссертационной работы и отзыв по данной диссертации заслушаны и обсуждены на заседании секции «Математическая биофизика» Ученого совета ИТЭБ РАН 12 ноября 2021 г., протокол № 5. Текст отзыва принят единогласно.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН)

Отзыв составил:

главный научный сотрудник
лаборатории биофизики
возбуждимых сред ИТЭБ РАН

д.ф.-м.н.

Г.Н. Чуев

Адрес: ул. Институтская, 3, ИТЭБ РАН, г. Пущино,
Московская область, 142290
Телефон: +7 (495) 632-78-69
Факс: +7 (4967) 33-05-53
Сайт: <https://iteb.ru>
Эл. почта: office@iteb.ru



Подпись: Чуева Г.Н.

УДОСТОВЕРЯЮ ЗАМ. ЗАВ. ОДОУ
С. Г. БАКАЕВА