

ОТЗЫВ

официального оппонента

о диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук **Коц Екатерины Дмитриевны**

на тему: «Молекулярное моделирование механизмов регуляции активности

ферментов человека» по специальности 02.00.17– «математическая и

квантовая химия»

Диссертационная работа Е.Д. Коц посвящена решению актуальной задачи современной математической и квантовой химии – компьютерному моделированию полного цикла работы аспартоцилазы - одного из важнейших ферментов, функционирующего в центральной нервной системе человека. Научная значимость теоретических исследований такого рода определяется тем, что современные вычислительные методы квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ), в совокупности с современными методами молекулярной динамики (МД), в настоящее время позволяют подойти к решению фундаментальной задачи энзимологии, биохимии и биофизики – выяснение физико-химические механизмов работы ферментов на молекулярном уровне. Современные вычислительные ресурсы (использование высокопроизводительных суперкомпьютеров) позволяют проводить моделирование не только взаимодействия субстратов и продуктов с отдельными функциональными группами каталитических и регуляторных центров фермента, но также изучать полный цикл работы фермента, включая моделирование динамики образования фермент-субстратного комплекса и выхода продуктов реакции в раствор. Выяснение молекулярных механизмов функционирования ферментов может иметь важное практическое значение для решения задач фармакологии и молекулярного дизайна лекарств и физиологически активных соединений. Таким образом, актуальность темы диссертационной работы Е.Д. Коц сомнений не вызывает.

В диссертации Е.Д. Коц представлены результаты комплексного исследования молекулярных механизмов ферментативного катализа на примере работы и регуляции этого одного фермента – аспартоацилазы человек (hAsp). Такой подход является вполне оправданным. Глубокий комплексный анализ работы одного фермента позволяет, первое, выявить фундаментальные закономерности работы ферментов и, второе, выработать надежную и эффективную методику теоретического исследования механизмов ферментативного катализа. Диссертация Е.Д. Коц построена по традиционной схеме. Она начинается с Введения, в котором кратко обоснована актуальность работы и сформулированы цели и задачи работы. В Главе 1 представлены литературные данные о пространственном строении и функционировании аспартоацилазы. Знакомство с этой главой свидетельствует о профессиональном владении соискателем материалом и ее умении наглядно представить те структуры, которые оказались в центре внимания данной работы. Результаты собственного исследования изложены в следующих шести главах диссертационной работы.

В Главе 2 приведены результаты квантово-химических расчетов изменения потенциальной энергии фермент-субстратного комплекса в ходе реакции гидролиза пептидной связи молекулы аспартоацилазы в каталитическом центре фермента. Расчеты выполнены методом КМ/ММ, квантово-химические расчеты проведены методом функционала плотности на высоком уровне теории, с использованием гибридного функционала PBE0 и базисных функций 6-31G**. Эти расчеты были выполнены сначала для основной (ограниченной) квантово-химической части системы, а затем уточнены для расширенной квантово-химической части фермента. В результате были найдены энергии стационарных точек на пути реакции гидролиза пептидной связи в молекуле *N*-ацетил-*L*-аспартата за счет нуклеофильной атаки молекулой воды. Представленные в Таблице 2 данные об энергетическом профиле реакции убедительно обоснованы и сомнений не

вызывают. Результаты, полученные в Главе 2, – первое, но исключительно важное звено в цепи исследований, направленных на расшифровку полного профиля каталитического цикла, связанного с работой фермента hAsp.

Для построения полного каталитического цикла работы hAsp необходимо знать энергетические характеристики процессов связывания ферментом молекулы субстрата и диссоциации продуктов реакции из каталитического центра фермента в раствор. Исследованию этих процессов посвящена Глава 3, в которой были получены профили этих реакций методом молекулярной динамики. Е.Д.Коц успешно справилась с поставленными задачами. Ей удалось рассчитать профиль свободной энергии реакции связывания субстрата с активным центром фермента, оценить энергетический барьер и стандартную энергию реакции образования фермент-субстратного комплекса ($\Delta G^0 = -6.7$ ккал/моль). Также были найдены возможные каналы диссоциации продуктов в раствор и показано, что процессы диссоциации сопряжены с преодолением сравнительно высоких потенциальных барьеров. Для стационарных точек ППЭ «химических» стадий реакции были также рассчитаны стандартные значения свободной энергии, что позволило сочлениить эти результаты с данными моделирования профилей изменения свободной энергии для «нехимических» (диффузионных) стадий (связывание/диссоциация субстратов/продуктов). В итоге, результатом исследований, описанных в Главах 2 и 3, стало построение полного профиля изменений свободной энергии в ходе каталитического цикла (рис. 25, стр. 55). При этом были определены ключевые стадии, соответствующие максимальным значениям энергетических барьеров, которые вносят определяющий вклад в результирующую скорость ферментативной реакции. Анализ всей совокупности расчетных данных методом Христиансена дал эффективное значение энергетического барьера 16,2 ккал/моль, что хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Соискательница не остановилась на достигнутых результатах и провела дальнейшее исследование, направленное на изучение эффектов взаимодействия фермента с молекулами субстрата, которые обуславливают аллостерическую активацию и ингибирование каталитической активности фермента и некоторые динамические особенности поведения гомодимерного комплекса молекулы hAsp, которые могут влиять на ее ферментативную активность (Главы 4, 5 и 6). Были найдены сайты связывания *N*-ацетил-*L*-аспартата, ответственные за аллостерические эффекты активации и ингибирования, а также получены интересные результаты, касающиеся влияния четвертичной структуры белка на его ферментативные свойства. В частности, на основании моделирования структурных изменений димерного комплекса hAsp было получено указание на то, что нековалентные взаимодействия между субъединицами hAsp могут способствовать повышению ферментативной активности hAsp. Определены возможные пути передачи активирующего и ингибирующего «сигналов» к каталитическим центрам фермента; показано, что эти пути различаются.

В Главе 7 представлены результаты моделирования, направленного на построение кинетической модели, учитывающей нескольких состояний фермента (открытые и закрытые состояния ворот одной из субъединиц фермента, ASPA) и динамику его конформационных перестроек. Целью этого исследования было построение модели, которая могла бы адекватно описать немонотонную зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Получены очень интересные результаты. В частности, оценки констант конформационных переходов методом молекулярной динамики показали, что связывание субстрата с центром активации вызывает открытие ворот, а последующее связывание субстрата центром инактивации вызывает закрытие ворот в активный центр фермента. Наконец, приведенная в Главе 7 кинетическая модель, основанная на полученных в работе значениях констант равновесия, показала прекрасное

согласие с экспериментальной зависимостью скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в растворе.

Подводя общий итог результатам исследования, представленного в диссертационной работе Е.Д.Коц, отмечу, что автором были получены чрезвычайно интересные и исключительно важные научные результаты в области математической и квантовой химии, проясняющие механизм работы фермента. Автором построена полноценная модель работы фермента, в которой впервые на молекулярном уровне было дано квантово-механическое описание ключевых «химических» стадий реакции в каталитическом центре фермента, детально проанализированы динамические особенности конформационных изменений белковой глобулы и описаны внутрибелковые каналы связывания субстратов и диссоциации продуктов реакции и энергетика их взаимодействия с молекулой фермента. Диссертация написана четким и ясным языком, иллюстративный материал очень наглядный, что дает возможность читателю легко проследить за изложением результатов исследования.

В то же время, следует отметить излишне краткий стиль изложения результатов проведенного исследования. Было бы полезно выделить в виде отдельной главы (или специального раздела приложения) методическую часть работы, в которой было бы дано описание использованных методов расчетов, оказавшихся разбросанными по разным главам диссертации. В частности, можно было бы подробнее остановиться на описании квантово-химической части системы. Например, читателю хотелось бы узнать, как согласуются друг с другом результаты основных расчетов, выполненных методом $\text{KM}(\text{DFT}/\text{PBE0}/6-31\text{G}^{**})/\text{MM}(\text{AMBER99})$, с результатами поиска геометрии активного сайта, полученными методом $\text{KM}(\text{DFT}/\text{PBE}/\text{DZVP})/\text{MM}(\text{CHARMM})$ (стр. 10 автореферата). Другой вопрос касается построения модельной системы на основании рентгеноструктурных данных. Например, на стр. 33 сообщается, что «функциональные группы Asp, Glu, Lys и Arg

были протонированы согласно значению $pH = 7$ ». Было бы целесообразно написать о том, какие значения pK_a этих аминокислотных остатков были выбраны при построении квантово-химической части модели. Это важно. Например, принято, что карбоксильная группа Glu178, которая является непосредственным участником каталитической реакции (последовательно принимает и отдает протон), в исходном состоянии депротонирована ($-COO^-$). Однако, хорошо известно, что значения pK_a карбоксильных групп, расположенных внутри белковой глобулы или находящихся в гидрофобном окружении, могут иметь гораздо более высокие значения pK_a . Поэтому необходимо было бы оценить значения pK_a этой и остальных протонируемых аминокислотных остатков, входящий в каталитический центр. При построении кинетической модели (Глава 7, стр.90-91) было бы целесообразно обосновать, почему не учитывается изменение концентрации активного фермента (состояние SESS), обусловленное диссоциацией в раствор продуктов реакции. Наконец, в п. 7 выводов автор ссылается на результаты, полученные для других ферментов (ацетилхолинэстераза, Arl3-RP2, Ras-GAP). Результаты этих исследований были получены при непосредственном участии Е.Д.Коц, они опубликованы в авторитетных научных журналах, однако, в диссертации эти результаты не описаны.

Указанные выше замечания не умаляют научной значимости диссертационной работы Е.Д. Коц. Ее работа представляет собой цельное, глубокое и оригинальное научное исследование, выполненное на высоком методическом уровне с использованием современных методов теоретической и квантовой химии. В работе Е.Д. Коц получены новые научные результаты, которые позволили впервые описать на молекулярном уровне полный цикл работы и механизмы регуляции аспартоацилазы - одного из важнейших ферментов человека. Соискателем выполнен большой объем работы и получен ряд новых научных результатов, имеющих приоритетное значение. Все научные положения и выводы, сформулированные в диссертации,

являются достоверными и глубоко обоснованными. Несомненно, что результаты работы Е.Д. Коц будут востребованы научным сообществом, как в нашей стране, так и за рубежом. Результаты исследования, представленного в диссертации, достаточно подробно отражены в 10 публикациях в высокорейтинговых международных и отечественных научных журналах (J. Phys. Chem. B, J. Chem Inf. Model., Biochem. J., Med. Chem. Comm. и др.). Эти исследования могут представлять интерес для широкого круга научных работников и преподавателей высших учебных заведений (в частности, для сотрудников Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Института биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Института биохимии имени А.Н.Баха РАН, Института химической физики имени Н.Н.Семенова РАН, Института биохимической физики имени Н.М.Эмануэля РАН и др. организаций), занимающихся проблемами квантовой химии, молекулярной динамики и их применением в различных областях энзимологии, биохимии, биофизики и молекулярной биологии.

Диссертация Е.Д. Коц полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам на соискание ученой степени кандидата наук. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.17 – «математическая и квантовая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Убежден, что соискатель, **Екатерина Дмитриевна Коц**, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 02.00.17– «математическая и квантовая химия».

Официальный оппонент:

Доктор физико-математических наук, профессор кафедры биофизики
физического факультета Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования «Московский
государственный университет имени М.В.Ломоносова»

ТИХОНОВ Александр Николаевич

1 марта 2018 года

Контактные данные:

тел.: 8(916)5187718, e-mail: an_tikhonov@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.00.02 – биофизика

Адрес места работы:

119991, Российская Федерация г. Москва, Ленинские горы, строение 2,
Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
физический факультет, кафедры биофизики

Тел.: 8(495)9392973; e-mail: an_tikhonov@physics.msu.ru

Декан физического факультета Московского государственного университета
имени М.В.Ломоносова

профессор



Н.Н.Сысоев