

ОТЗЫВ

Члена диссертационного совета Петухова Михаила Геннадьевича на диссертацию Измайлова Сергея Александровича на тему: «Разработка и приложение алгоритмов молекулярной динамики и спиновой динамики в исследованиях полипептидных цепей: от неупорядоченных пептидов к кристаллическим белкам», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.2.2 - Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ.

В представленной работе автором разработаны и протестированы новые методы и соответствующие программы, а также библиотеки для исследования молекулярной динамики (МД) пептидов и глобулярных белков. В частности:

1. Разработаны методы моделирования спиновой динамики, использование которых позволяет получить структурную интерпретацию данных ЯМР спектроскопии неструктурированных пептидов и глобулярных белков. Предложенный метод был верифицирован на примере модельного пептида, соответствующего N-концевому участку гистона H4 человека. Было показано, что экспериментальные данные спиновой релаксации, полученные с помощью ЯМР успешно воспроизводятся методом МД в периодическом водном боксе с применением модели воды TIP4P-D.
2. В работе разработан также новый метод структурной интерпретации спектров ЭПР спин-меченых белков с помощью моделирования МД. Этот метод позволяет теоретически рассчитывать форму ЭПР спектров белков на основе данных МД. Алгоритм расчета спектров ЭПР использует решение уравнения Лиувилля – фон Неймана для матрицы плотности двухспиновой системы, состоящей из спина электрона и спаренного с ним ядерного спина ^{14}N (или ^{15}N). В качестве модельной системы был выбран небольшой глобулярный белок GB1, для которого были изготовлены 7 цистеин-содержащих мутантов, конъюгированных с нитроксильной меткой MTSL, и получены соответствующие спектры ЭПР. Расчетные спектры показали хорошее согласие с экспериментальными данными. Показано, что форма спектра в первую очередь определяется конформационной подвижностью спиновой метки и несет очень мало информации о структуре и динамике исследуемого белка. Хотя этот результат и является формально отрицательным, он имеет большое значение в области ЭПР спектроскопии белков.
3. Предложен и реализован в виде программ метод моделирования МД белков с изменяющейся ковалентной структурой. Метод верифицирован на примере небольшого пептидного гормона гуанилина, содержащего в своем составе 4 остатка цистеина, образующего в процессе свертки два дисульфидных мостика. Было показано, что распределение изомеров гуанилина, находится в качественном согласии с экспериментальными данными, полученными с помощью HPLC. Особенно практически ценным является то обстоятельство, что эта разработка выполнена на базе AMBER широко используемого пакета программ для моделирования МД белков, не обладающего функциональными возможностями моделирования динамики белков с переменной ковалентной структурой.

4. Кроме того, в работе с помощью метода МД и твердотельной ЯМР спектроскопии исследовалась конформационная подвижность белка убиквитина в водном окружении и в двух его кристаллических формах – в форме орторомбического кристалла (в присутствии метилпентандиола) и кубического кристалла (в присутствии полиэтиленгликоля). Показано, что в некоторых случаях конформационная подвижность белка зависит от локального окружения и может существенно отличаться в кристаллических формах исследуемых белков по сравнению с их конформационной подвижностью в водном окружении.

Хотя представленные в работе результаты весьма важны и интересны, работа имеет также и недостатки. В частности:

- 1) В работе имеются более 400 ссылок на различные публикации по теме работы, однако отдельный, хорошо структурированный литературный обзор по методической и прикладной части полученных автором результатов отсутствует. Поэтому, читателю трудно составить достаточно полное представление о текущем положении дел в данной области научных исследований, а также о конкурирующих подходах в решении поставленных в работе весьма амбициозных задач. Не сформулированы также в краткой и ясной форме положения, выносимые на защиту.
- 2) В секции “Заключение” имеются на мой взгляд недостаточно обоснованные выводы.
 - а. Например, для того чтобы сделать вывод, что “...фолдинг гуанилина протекает под кинетическим контролем, т.е. наиболее широко представленные изомеры не являются энергетически наиболее выгодными...” необходимо знание глобального энергетического минимума этого белка. Эти исследования в работе не проводились и нет никаких оснований считать, что структуры исследуемого белка, полученные с помощью методов ЯМР спектроскопии или кристаллографии находятся в глобальном минимуме энергии. Высокая заселенность конформаций белка, встречающихся в МД и имеющих более высокие энергии в потенциале AMBER по сравнению с конформациями с низкой заселенностью тоже вряд ли может служить серьезным аргументом в пользу “кинетического контроля” процесса сворачивания белка, хотя бы потому, что расчеты свободной энергии этих конформационных состояний белка в представленной работе не проводились.
 - б. На мой взгляд, наблюдаемые автором локальные стерические ограничения подвижности спиновой метки всегда остаются локальными, вряд ли можно эти наблюдения обобщить как влияние стандартных элементов вторичной структуры белка, имеющих, как правило, гораздо большие размеры. В любом случае, такой вывод как: “было показано, что они (*т.е. конформационные предпочтения спиновой метки*) определяются стерическими факторами, которые в свою очередь зависят от вторичной структуры белка в точке прикрепления метки” можно сделать только на основе анализа многих примеров, чего в работе сделано не было.
- 3) В целом работа хорошо написана и тщательно отредактирована, однако иногда встречаются не являющиеся абсолютно необходимыми заимствования из англ. языка, такие как “фолдинг”, “абerrантные сборки” и др. Также в тексте диссертации

иногда встречается нестандартная терминология и лабораторный жаргон, например: “тело”, “хвост”, “хвост-тело” белка, “пропагаторы” итд.

Несмотря на отмеченные недостатки считаю, что мои замечания не снижают ценность представленной к защите работы, а представленные результаты являются оригинальными, интересными и важными не только в качестве дополнительного инструментария для исследования пептидов и белков, но и для понимания механизмов действия глобулярных водорастворимых белков. Созданное в работе программное обеспечение (ПО) представлено в виде дополнительных библиотек для AMBER, широко используемого пакета программ для моделирования МД белков и других биомакромолекул и поэтому, созданное автором ПО будет использовано другими исследователями. А представленные результаты опубликованы в 4 статьях в ведущих международных научных журналах по данной тематике.

Диссертация Измайлова Сергея Александровича на тему: «Разработка и приложение алгоритмов молекулярной динамики и спиновой динамики в исследованиях полипептидных цепей: от неупорядоченных пептидов к кристаллическим белкам» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 01.09.2016 № 6821/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Измайлов Сергей Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.2.2 - Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Член диссертационного совета,

доктор физико-математических наук, доцент, в.н.с.,

Петербургский институт ядерной физики,

НИЦ “Курчатовский институт”

/Петухов М.Г./

7 сентября 2021 г.

