

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Метелешко Юлии Игоревны
на тему: «Молекулярное моделирование мутантных форм
флуоресцентных белков на основе LOV доменов с измененными
спектральными свойствами»
по специальности 1.4.4 – «Физическая химия»

В диссертационной работе Метелешко Юлии Игоревны «Молекулярное моделирование мутантных форм флуоресцентных белков на основе LOV доменов с измененными спектральными свойствами» используются современные методы компьютерного моделирования для решения важной практической задачи тюнинга спектральных свойств существующих флуоресцентных белков, используемых в качестве флуоресцентных меток для визуализации различных клеточных процессов.

Прогресс в области компьютерного оборудования, а также развитие методов компьютерного моделирования, делает их использование все более доступным для широкого круга исследований в разных областях науки. В частности, становится возможным использование методов молекулярного моделирования для решения практических задач рационального дизайна биомолекул с заданными свойствами.

Рациональный дизайн начинается с анализа взаимосвязи функциональных особенностей изучаемых систем и их структуры, на основе которого делаются выводы о том, какие именно структурные изменения необходимы для получения нужных свойств. Такой подход успешно применяется в том числе и для получения флуоресцентных белков с заданными спектральными свойствами. В рамках этого подхода в данной работе были использованы такие современные методы компьютерного моделирования, как молекулярная динамика и комбинированный метод квантовой механики / молекулярной механики для изучения структур и

метод ХМСQDPT2 для расчета спектральных свойств флуоресцентных белков на основе LOV доменов, что обуславливает актуальность темы данной диссертационной работы.

Де-факто работа относится к области визуального молекулярного моделирования свойств отдельных биологических объектов и комплексов лиганд–мишень; т.е. затрагивает интересы классического докинга, используя при этом методы квантовохимических расчетов. Это то, чего всегда не хватало классическому докингу, на 99% основанному на молекулярной механике/динамике, и поэтому работа представляет собой качественную ступеньку в моделировании белков и комплексов лиганд–мишень.

В силу того, что рассчитывается и пространственно локализуется каждый отдельный комплекс *вручную*, и при этом весьма сложными методами, работа лишена сотен пустых, автоматически сгенерированных компьютером пространственных конфигураций, основанных на имеющихся (обычно недостаточных) данных. Это достоинство, которое не оценено поборниками принципов цифровизации типа «берем миллион структур и обрабатываем их нейросетями с машинным обучением, получаем нужную конфигурацию». Нейросети и машинное обучение для таких объектов – это даже не бантик, это путь к заведомо неверному результату моделирования (проверено автором отзыва).

Валидация применяемых протоколов расчетов на системах, для которых есть экспериментальные значения максимумов поглощения и испускания, обеспечивает достоверность полученных в диссертационной работе результатов.

Работа также имеет существенное значение для практического применения как в области исследования клеточных процессов, так и в области клинической диагностики.

Диссертационная работа включает в себя следующие части: введение, обзор литературы, расчетную часть, изложение и обсуждение результатов, заключение, выводы, список используемых сокращений и обозначений,

список литературы, содержащий 85 наименований, и 4 приложения. Диссертация написана на 125 страницах и содержит 23 таблицы и 72 рисунка.

Во введении приведено обоснование актуальности темы диссертационной работы, поставлены цели и задачи работы, описана научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Глава 1 представляет собой литературный обзор. Подробно рассмотрены исследуемые в этой работе объекты, а именно LOV домены и флавинсодержащие флуоресцентные белки. В главе рассмотрены структура и функции LOV доменов, описана характерная для них фотореакция, а также указаны варианты их практического применения и имеющиеся ограничения.

Глава 2 содержит описание применяемых в работе методов и протоколы проведенных расчетов. Приведены подробности построения моделей для исследуемых систем, параметры молекулярно-динамического моделирования, процедура оптимизации геометрии белковых макромолекул комбинированным методом квантовой механики / молекулярной механики. Указаны составы квантовых подсистем для изучаемых белков. Описаны оценка значений вертикальных энергий поглощения и испускания и расчеты других фотофизических свойств.

Глава 3 содержит полученные в диссертационной работе результаты и их обсуждение. В разделах 3.1–3.3 рассматривается флавинсодержащий флуоресцентный белок iLOV и его мутантные формы. Для получения вариантов этого белка, обладающих батохромным сдвигом спектральных полос, используется подход, заключающийся в помещении положительно заряженной аминокислоты рядом с теми атомами хромофора, на которых происходит увеличение электронной плотности в возбужденном состоянии. Были подобраны аминокислотные замены, включающие положительно заряженный лизин (V392K и Q489K), отвечающий за стабилизацию возбужденного состояния хромофора, и аминокислоты, удерживающие боковую цепь лизина рядом с ним. Также для iLOV и его мутантных форм

был произведен подбор новых хромофоров, демонстрирующих батохромный сдвиг по сравнению с оригинальным.

Раздел 3.4 диссертационной работы посвящен обратимо переключаемым флуоресцентным белкам rsLOV1 и rsLOV2. Были исследованы структуры белков rsLOV1 и rsLOV2 и также белка YtvA-LOV, из которого они были получены, и найдены отличия, приводящие к увеличению эффективности фотопереключения.

В заключении даны ценные рекомендации, обладающие несомненной практической и теоретической значимостью, по видам мутантной модификации флуоресцентных белков на основе LOV доменов, обладающих батохромным сдвигом спектральных полос.

Выводы, сделанные в диссертационной работе, наряду с положениями, выносимыми на защиту, являются хорошо сформулированными, новыми и полностью обоснованными.

Диссертационная работа написана четко и логично, однако к ней имеются следующие **замечания и вопросы**:

1. Текст хорошо понимается специалистами в вычислительной области, еще и работающими с подобными биологическими объектами. Но широта применения результатов исследований предполагает расшифровку и пояснения для неспециалистов: в самом начале текста диссертации и автореферата, было бы полезным дать пояснения:
 - в значимости работы – какие процессы в клетке и, как макро-следствие, в живом организме, могут быть идентифицированы обсуждаемыми флуоресцентными метками и, главное, какова область практического применения;
 - при первом упоминании (дополнительно к таблице сокращений в конце текста) расшифровать и одной фразой пояснить аббревиатуры белков, пояснить, что такое «окно прозрачности», может быть, даже «батохромный сдвиг» и «эффективность фотопереключения» (в

последнем случае физики и химики часто понимают разные параметры – одни чувствительность, другие скорость перехода).

2. Несколько неудачно в цели работы сформулировано «предложить способы получения новых флуоресцентных белков» - поскольку это подразумевает именно практические способы получения/выделения. Тем более что в выводах достижение такой цели никак не отражено. Более точно было бы «предложить направления структурной модификации», далее по тексту.
3. Достоверность результатов не может просто подтверждаться используемыми современными методами, которые совершенно необязательно истина в последней инстанции – она подтверждается «современными методами, показавшими свою эффективность на подобных биологических объектах». Основной показатель достоверности – это совпадение результатов вычислений с контрольной выборкой описанных экспериментальных данных.
4. В диссертационной работе применяется большой арсенал методов компьютерного моделирования, однако в главе 2, посвященной описанию использованных методов и протоколов расчетов, сами методы описаны довольно скудно. Снова возникает потребность популярно объяснить для неспециалистов, что конкретно и как рассчитывалось. При этом предполагается, что методы модификации структуры (подбор аминокислотных остатков) следуют из сравнения литературных данных и обсуждения результатов, но неспециалист такое сравнение провести не может, и создается некоторое ощущение несистематичности подбора модификантов.
5. Визуальная составляющая диссертационной работы выглядит несколько разнородно и местами перегружена, но вместе с тем является достаточной и информативной. Это очень важно в расчетных работах.

6. Автор старательно избегает терминологии статистического анализа структурных данных, несмотря на то что работа лежит в русле количественной связи структура-спектры (QSSR). Не вижу в этих терминах ничего страшного, они никак не связаны с первыми вариантами QSAR, которые давали положительный результат только случайно. А примеров полезности исходных (фильтрующих) построений QSAR для докинга и даже квантовохимических вариантов моделирования в литературе предостаточно. И в данной работе такой анализ применяется в явной форме для последующего визуального моделирования.
7. То, что всегда ставится в укор «чистым» физико-химическим работам: в идеале - практическая валидация, т.е. экспериментальные параметры хотя бы для 1–2 рассчитанных объектов, были бы в высшей степени положительно восприняты в разделе «валидация результатов расчетов», а также в практической деятельности, включая медицину. Но, конечно, это значительно превышает уровень любой кандидатской работы.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.4 – «Физическая 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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Метелешко Юлия Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4 – «Физическая химия».

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярного моделирования и направленного синтеза

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

Свитанько Игорь Валентинович



13.06.2023 г.

Контактные данные:

тел.: +7(499)137-87-09, e-mail: svitanko@ioc.ac.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.03 – Органическая химия

Адрес места работы:

119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

Тел.: +7(499)137-29-44,; e-mail: secretary@ioc.ac.ru

Подпись с _____ ИОХ РАН И.В. Свитанько удостоверяю:

Ученый с _____ ИОХ РАН



Коршевец И.К.

13.06.2023г.