

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Изотовой Екатерины Дмитриевны** на тему **«Роль структурных особенностей каталитического действия силикатеина- $\alpha$  в процессе биосилификации по данным компьютерного моделирования»**, представляемую на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 — Биофизика

Силикатеин- $\alpha$  считается основным белком биосилификации губок рода *Demosponge*. Отличительной особенностью данного фермента является то, что он обладает как каталитической активностью, так и является основным компонентом аксиального филамента спикулы. Наличие этих двух активностей приводит к формированию кварцево-подобных скелетных элементов.

В связи с двойной активностью силикатеин- $\alpha$  является потенциально перспективным ферментом в области современного наукоемкого производства, а кремнийорганические соединения уже на сегодняшний день нашли широкое применение в роли катализаторов, полимерных наполнителей, компонентов систем доставки лекарственных средств.

Однако именно эти два типа активности данного фермента до сих пор являются дискуссионными. Анализ первичной последовательности и пространственной структуры силикатеина- $\alpha$  показал, что он наиболее гомологичен L-подобным катепсинам (катепсины семейства L, K, S), однако, в активном центре вместо аминокислотного остатка Cys (как у катепсинов) присутствует Ser, кроме того, ряд других особенностей в структуре приводит к изменению размеров полости активного центра и спектра используемых субстратов.

Выявление областей потенциального связывания кремниевых кислот с поверхностью силикатеина- $\alpha$  и взаимная стыковки отдельных белков являются важными фундаментальными вопросами биофизических процессов как на уровне поведения отдельных макромолекул, так и на уровне физиологии и

жизнедеятельности самого организма.

Таким образом, соискателем делается попытка разобраться в ферментативном механизме активации кремниевых кислот, который в дальнейшем приведет к их полимеризации, а также выявить области связывания кремниевых кислот различной степени ветвления с поверхностью силикатеина- $\alpha$ . В связи с вышесказанным, актуальность темы диссертации Е.Д. Изотовой не вызывает сомнений.

Работа имеет классическую структуру и представлена на 148 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений А-В. Иллюстрационный материал представлен 2 таблицами и 42 рисунками. В раздел «Приложения» вынесено 12 таблиц и 10 рисунков, разделенных по главам работы.

Во "Введении" диссертант обосновывает постановку проблемы, формулирует актуальность исследования, определяет цели и задачи работы, а также отмечает научную новизну, научно-практическую значимость проведенного исследования.

В разделе "Обзор литературы" автор уделяет внимание нескольким аспектам диссертационной работы. Во-первых, освещается механизм спиккулогенеза в *Demosponge* и роль различных факторов биосилификации, таких как концентрация исходного субстрата, согласованность действия таких макромолекул как: силикатеинов, силинтафина-1 и силинтафина-2, галектина, глассина, гликопротеинов и протеогликанов. Освещается пространственная структура силикатеина- $\alpha$  и его сходство с другими белками. Большое внимание автором уделено механизмам действия сериновых протеаз, которые, кроме классической триады аминокислотных остатков в активном центре: Ser, His, Asp, могут иметь и другие комбинации аминокислотных остатков – Ser, His, Glu / Ser, His, His / Ser, Glu, Asp.

Второй блок обзора литературы посвящен оценке литературных источников, описывающих физико-химические процессы конденсации и

полимеризации кремниевых кислот в водном растворе, а также влияние этих факторов на степень ветвления кремниевых кислот, форму и размер образовавшегося кремнезема. Поскольку природными субстратами силикатеина- $\alpha$  являются кремниевые кислоты с различной длиной цепочки, Изотова Е.Д. в обзоре литературы уделяет также внимание олигомерному разнообразию низших кремниевых кислот.

Глава "Объекты и методы исследования" содержит обоснование использования молекулярных моделей силикатеина- $\alpha$  и пре-силикатеина- $\alpha$ . Автор в работе использует широкий арсенал взаимодополняющих методов: методы молекулярной динамики (реакционное силовое поле Feuston и Garofalini для оценки субстратного разнообразия кремниевых кислот в водном растворе и потенциал CHARMM36 в программном пакете NAMD-multicore CUDA для подготовки молекулярной структуры силикатеина- $\alpha$  и оценки его среднеквадратичной подвижности и аминокислотных остатков активного центра), метод молекулярного докинга белок-лиганд для определения областей связывания природных субстратов с поверхностью силикатеина- $\alpha$  и белок-белковый докинг для выявления областей стыковки белковых субъединиц, приводящих к формированию фибрилл. Также автор использует полуэмпирический метод AM1 и метод DFT с функционалом X3LYP в базисах 6-31G(d)/6-311++G(2d,p) (в программе PCGAMESS/Firefly) для оценки влияния степени протонирования имидазольного кольца His на начальный этап активации кремниевой кислоты.

Для подготовки молекулярных моделей и обработки большого пула данных автором разработан и реализован код программы на языке программирования Python. На фрагмент кода автором получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ. Следует отметить, что автор в работе адекватно использует методы статистической обработки и представления данных.

Глава 3 посвящена расчету энергии основного состояния комплекса каталитической триады силикатеина- $\alpha$  и субстрата  $\text{Si}(\text{OH})_4$ . Автор конструирует

8 молекулярных конформационных изомеров активного центра и оценивает энергию основного состояния комплекса, а также характер распределения парциальных зарядов на атомах и взаимную ориентацию водородных связей между аминокислотными остатками активного центра и субстратом. Для комплексов, в которых потенциально возможен перенос протона, приводящий к активации субстрата, построены поверхности потенциальной энергии перемещения протона и определены энергетические барьеры.

Глава 4 посвящена поиску областей связывания кремнивых кислот поверхностью силикатеина- $\alpha$ . Методами молекулярной динамики автором продемонстрировано, что в водном растворе, при нейтральном значении pH доминируют линейные и разветвленные формы кремниевых кислот. 14 низших кремниевых кислот были использованы в качестве лигандов в молекулярном докинге в программе ROSIE. Среди групп изомеров максимальной аффинностью обладают комплексы фермент-линейный или разветвленный лиганд, при этом кремниевые кислоты ( $Si_n=1-4$ ) имеют максимальную энергию связывания с активным центром, лиганды большего размера предпочтительнее связываются с областью вблизи Thr329 (пре-силикатеин- $\alpha$ ) и Asp6 (силикатеин- $\alpha$ ).

Достоверность представленных данных обусловлена корректностью применимости методологических подходов и используемых вычислительных методов: метод молекулярной динамики (потенциал CHARMM36 в программном пакете NAMD-multicore CUDA), *ab initio* расчеты (AM1 и метод DFT с функционалами B3LYP и X3LYP в базисах 6-31G(d)/6-311++G(2d,p), в программе PCGAMESS/Firefly), а также молекулярный докинг с использованием сервисов BSP-SLIM и ROSIE.

К несомненным достоинствам работы можно отнести подробное описание методик исследований, что позволяет легко их воспроизвести, а также корректное сопоставление расчетных экспериментов с лабораторными данными. Необходимо отметить, что диссертация написана системно и логично, полученные автором результаты наглядно проиллюстрированы.

Из недостатков работы хочу отметить следующее:

1. Автором использовался докинг (ROSIE и BSP-SLIM) с гибким лигандом, в качестве которого выступала молекула ортокремниевой кислоты ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ). Данный лиганд имеет всего 4 торсионных угла на вращение боковых гидроксильных групп. В качестве же рецептора использовались структуры фермента химерной формы 2VHS (силикатеин- $\alpha$ ) и пре-силикатеина- $\alpha$  *Tethya aurantium* (NCBI: AAC23951.1). В работе обнаружено и исследовано восемь зарядовых и топологических состояний активного центра фермента, который составляет каталитическая триада (His163, Ser25, Gln19). Они отличаются энергией связывания, а также количеством и длиной водородных связей. Сама процедура докинга вопросов не вызывает, однако, поскольку система белок-лиганд функционирует в явном избытке лиганда (что было смоделировано с помощью молекулярной динамики), то представляют интерес особенности связывания ортокремниевой кислоты на уже собранный фермент-субстратный комплекс. Данный процесс может быть смоделирован при помощи каскадного, многостадийного докинга, когда на каждом этапе расчета к системе добавляется одна молекула лиганда и вычисляется ее оптимальное связывание на белок, к глобуле которого уже прикреплены лиганды из предыдущих итераций такого расчета.

2. По поводу визуализации получаемых комплексов соискателю рекомендуется использовать инструменты типа PLIP и LigPLOT – каждый из них дает как наглядные изображения комплексов между лигандом и рецептором, так и классифицирует типы связей, их длины, а также номера аминокислотных остатков из состава ферментов, которые участвуют в формировании межмолекулярных связей.

3. В работе содержатся и результаты белок-белкового докинга. Как и любой итог теоретического расчета, он требует осторожности в интерпретации, особенно когда эти результаты нет возможности сравнить с экспериментом. Автором обнаружено отсутствие взаимного перекрытия областей: активного центра, центров потенциального связывания с природными субстратами и

областью связывания со второй молекулой силикатеина- $\alpha$ . Кроме того, была изучена структура пре-силикатеина- $\alpha$ . Автором выявлены области, которые могут регулировать его созревание в зависимости от условий, причем силикаты могут участвовать в этом процессе. Хочется надеяться, что диссертантом будут проведены прямые эксперименты, которые подтвердят высказанные автором гипотезы: решение пространственной структуры комплексов силикатеина- $\alpha$  с ингибиторами, направленный аланиновый скрининг по остаткам активного центра силикатеина- $\alpha$ , а также анализ упаковки глобул природных мутантов данного, безусловно любопытного, фермента.

4. Интересно было бы подробно изучить отличия в структурах силикатеина- $\alpha$  и белка катепсина-L *Human sapiens* (PDB ID: 2VHS), обладающих кремнийполимеризующей активностью, и, папаиноподобных протеаз, например, папаина (PDB ID: 9PAP), который не обладает названным типом активности, но при этом имеет 98 % перекрывания аминокислотной последовательности (Query Cover) с молекулой силикатеина- $\alpha$  (PDB ID: 6ZQ3\_A).

Вышеуказанные замечания не снижают научной значимости и достоверности полученных автором результатов. Диссертационная работа Изотовой Е.Д. является актуальной, имеет внутреннее единство, а также научную и практическую значимость представленных материалов.

Результаты диссертационной работы представлены в 5 журналах из перечня ВАК РФ, 9 тезисах конференций Всероссийского и Международного уровня, также автором получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Диссертационная работа «Роль структурных особенностей каталитического действия силикатеина- $\alpha$  в процессе биосилификации по данным компьютерного моделирования» соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 года (в редакции Постановления Правительства РФ от 11.09.2021 г. № 1539), является

законченной научно-квалификационной работой. Автор работы, Изотова Екатерина Дмитриевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 — Биофизика.

Официальный оппонент:

д.б.н., доцент, профессор кафедры биофизики и биотехнологии,  
ФГБОУ ВО «Воронежского государственного университета»  
(специальность 03.01.02 - Биофизика)

д.б.н., доцент, профессор

  
(подпись)

/Холявка Марина Геннадьевна/

24 ноября 2021 г.

адрес организации: 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, 1

тел: +7 (473)220-5-21

e-mail: marinaholyavka@yahoo.com

