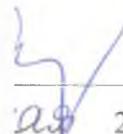


“УТВЕРЖДАЮ”

Директор Федерального государственного
учреждения «Федеральный исследовательский
центр Институт прикладной математики им.
М.В.Келдыша Российской академии наук»
или коротко ИАПН




А.И.Аптекарев
2017 года

ОТЗЫВ

ведущей организации о диссертационной работе

Прокофьева Игоря Игоревича

«Селективность пиримидинфосфорилазы холерного вибриона к природным нуклеозидам и ксенобиотикам по результатам рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования биомакромолекулярных комплексов», представленной на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «кристаллография, физика кристаллов».

Актуальность темы исследования.

Фермент уридинфосфорилаза принадлежит к классу пиридинфосфорилаз и осуществляет обратимую реакцию фосфоролитического расщепления до азотистых оснований как уридина, так и с меньшей эффективностью тимидина. Уридинфосфорилаза играет важную роль в метаболических процессах. В частности, в клетках многих видов опухолей человека и в возбудителях инфекций, при развитии заболевания, увеличивается потребность в азотистых пиримидиновых основаниях, что повышает уровень экспрессии уридинфосфорилазы. Субстратную специфичность уридинфосфорилаз необходимо учитывать и при разработке противоопухолевых, антибактериальных и антипаразитарных лекарственных препаратов нуклеозидной природы, метаболизирующихся уридинфосфорилазами. Помимо фармации уридинфосфорилаза и её

лиганды, в частности субстраты и ингибиторы, востребованы и в биотехнологии, и их рациональное использование требует знания структурной основы субстратной специфичности энзима-мишени. Следует отметить, что, в то время как химическая специфичность уридинфосфорилаз интенсивно исследуется, то структурному аспекту субстратной специфичности до сих пор было уделено недостаточно внимания. Это обстоятельство определяет актуальность проведенного исследования, целью которого являлось установление структурных особенностей специфичности уридинфосфорилазы (и, в более общем случае, пиримидинфосфорилаз) к лигандам.

Научная новизна исследования.

Впервые анализ структурной обусловленности субстратной специфичности уридинфосфорилазы проведен на основе структур серии комплексов фермента с различными субстратами (прямой реакции: фосфат-анионом, уридином, тимидином; обратной реакции: урацилом, тиминном; и псевдосубстратами: цитозинном и 6-метилурацилом), определенных при высоком разрешении. Для этой цели впервые были выращены кристаллы этих комплексов, демонстрирующие рентгеновскую дифракцию разрешения выше 1.5Å, и решены структуры этих комплексов. Впервые установлена роль фосфат-аниона в регулировании переключения, перекрывающей вход в активный центр петли L11, из открытого в закрытое состояние. Установлено, что упоминающееся в литературе "промежуточное" состояние петли является артефактом метода и возникает вследствие контактов соседних гексамеров фермента в кристалле. На основе анализа сети водородных связей, частичных зарядов и энергии взаимодействия установлены причины разных скоростей прямой ферментативной реакции с уридином и тимидином и обратной реакции с урацилом и тиминном. Проанализированы структурные и квантовохимические аспекты специфичности VchUPh к псевдосубстратам 6-метилурацилу и цитозину – лигандам, связывающихся с ферментом, но не приводящим к ферментативной реакции

Научно-практическая значимость.

Результаты проведенного исследования имеют фундаментальное значение и вносят существенный вклад в понимание структурных особенностей функционирования уридинфосфорилаз и их субстратной специфичности. Структурно-обусловленный поиск

ингибиторов уридинфосфорилаз являются перспективным подходом к созданию новых лекарственных препаратов для лечения онкологических и некоторых инфекционных заболеваний, вызванными бактериями и простейшими организмами. Помимо этого, уридинфосфорилаза становится многообещающим биотехнологически значимым ферментом, и знание ее структурных особенностей открывает пути для повышения её эффективности (посредством генно-инженерной модификации) при использовании в промышленном ферментативном синтезе биологически активных нуклеозидов.

Достоверность результатов, положений и выводов.

Основные результаты и выводы базируются на структурных данных высокого разрешения для семи комплексов уридинфосфорилазы с различными лигандами, полученных методом рентгеноструктурного анализа монокристаллов. В ряде случаев, при исследовании вторых субстратов обратной реакции, к исследованию были подключены результаты компьютерного моделирования. Координаты атомов пространственных структур 15 макромолекулярных соединений по теме диссертации и соответствующие им наборы экспериментальных модулей структурных факторов депонированы в международный банк белковых структур (PDB). Дополнительным фактором, обеспечивающим надежность выводов, является то, что структурные данные были получены для единообразно приготовленных комплексов уридинфосфорилазы из одного и того же источника - патогенной бактерии *Vibrio cholerae*. Достоверность и обоснованность результатов, изложенных в диссертационной работе, а также выводов работы подтверждается использованием широко апробированных научных методов, совпадением полученных результатов с доступными экспериментальными и теоретическими результатами других авторов. Результаты были апробированы на международных конференциях и опубликованы в цитируемых научных изданиях.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы и списка сокращений. Объем работы – 142 машинописных страниц, включающих 41 рисунок, 9 таблиц, список из 184 литературных источников, процитированных в диссертации.

Во введении сформулированы цели и задачи работы, положения, выносимые на защиту, аргументированы актуальность и практическая значимость работы, обозначена научная новизна работы.

Первая глава посвящена детальному литературному обзору, в который включены общие сведения о пиримидинфосфорилазах (и одном из ферментов этой группы - уридинфосфорилазе, УФ), история их открытия, сведения о роли этих ферментов в биологических процессах и медицинских приложениях, биохимическая и структурная характеристика уридинфосфорилазы. Изложенные автором диссертации сведения естественным образом приводят к формулировке поставленных в исследовании задач и выбору методов их решения. Одной из важнейших частей обзора являются разделы, посвященные описанию роли УФ, ее субстратов и ингибиторов в ряде медицинских приложений, таких как регуляция активности УФ в опухолевых клетках, использования этого фермента в качестве потенциального маркера при некоторых видах рака, защитной роли субстрата УФ уридина при ишемии нервной ткани, перспектив использования ингибиторов УФ как противомикробных и противопаразитарных препаратов. Приведенные сведения обосновывают актуальность поставленных в исследовании задач. Проведенный анализ структурных особенностей уридинфосфорилаз из разных источников показал гомологию и сходство пространственной организации аминокислотных остатков сайтов связывания, несмотря на низкую гомологию первичных последовательностей в целом. Это обуславливает необходимость установления структурных основ субстратной специфичности фермента для решения задач поиска новых лекарственных препаратов, направленных на регулирование функционирования уридинфосфорилаз. Проведенный поиск показал, что большая часть имеющейся в банке белковых структур (PDB) информации об уридинфосфорилазах получена на основе экспериментальных данных недостаточного высокого разрешения. Поэтому была поставлена задача получения информации более высокого разрешения о структуре УФ и ее комплексов с субстратами прямой и обратной реакций. В качестве основного метода решения этой задачи был выбран метод рентгеноструктурного анализа, дополненный методами молекулярного моделирования.

Вторая глава содержит описание деталей экспериментальных методов, примененных в исследовании. Основой для анализа селективности уридинфосфорилазы

явились определенные с высоким разрешением структуры семи комплексов уридинфосфорилазы холерного вибриона (VchUPh) с субстратами прямой реакции: фосфат-анионом, уридином, тимидином; обратной реакции: урацилом, тиминном; и псевдосубстратами: цитозином и 6-метилурацилом. В этой главе описаны методики, использованные при определении этих структур: клонирование, экспрессия гена и выделение и очистка VchUPh; кристаллизация комплексов VchUPh с субстратами и псевдосубстратами; сбор и обработка дифракционных данных; решение методом молекулярного замещения и уточнение пространственных структур. Для исследования зависимости химико-физических свойств лигандов от их строения и связи этих свойств с селективностью фермента использовались теоретические методы анализа структур, также описанные во второй главе: расчет частичных электрических зарядов атомов, расчет энергии конформаций субстратов в комплексе с VchUPh и в водном растворе. Ввиду отсутствия надлежащего качества кристаллов комплексов VchUPh с тиминном и урацилом и вторыми субстратами обратной реакции (рибозо-1-фосфатом и 2-дезоксирибозо-1-фосфатом), эти структуры были определены методами молекулярного докинга. Детали использованного подхода также отражены во второй главе.

Третья глава диссертации посвящена анализу полученных структурных данных. Глава начинается с анализа кристаллической упаковки фермента и описания кристаллографических и биологических интерфейсов гексамера уридинфосфорилазы. Далее автор переходит к анализу конформационных изменений, происходящих в структуре VchUPh при связывании с лигандом. Из наиболее важных результатов этого анализа стоит отметить установление влияния присутствия фосфат-аниона на функциональное состояние петли-"шлагбаума" L11, перекрывающей в "закрытом" состоянии доступ в активный центр. Обнаружено, что даже в закрытом состоянии эта петля и связанные с ней элементы вторичной структуры сохраняют существенную подвижность и могут присутствовать во множественных конформациях. Показано также, что описанное в ряде публикаций "промежуточное" состояние этой петли является артефактом метода и возникает вследствие контакта соседних гексамеров в кристалле. Далее в главе описываются структурные аспекты специфичности VchUPh к субстратам прямой и обратной реакций. Здесь автор, помимо структурной информации, полученной методом рентгеноструктурного анализа, привлекает к исследованию дополнительную

информацию о частичных зарядах и энергии различных конформаций лигандов. Эти подходы позволяют сформулировать причины разных скоростей прямой ферментативной реакции с уридином и тимидином и обратной реакции с урацилом и тимином. В обратной ферментативной реакции помимо урацила или тимина участвуют вторые субстраты, комплексы с которыми кристаллизовать не удалось. Для изучения вопросов, связанных с влиянием этих субстратов на скорости ферментативных реакций, структура комплексов уридинфосфорилазы с этими ферментами была смоделирована методами молекулярного докинга. В последней части этой главы анализируются структурные и квантовохимические аспекты специфичности VchUPh к псевдосубстратам – 6-метилурацилу и цитозину. Эти лиганды, хотя и связываются с ферментом, не приводят к осуществлению ферментативной реакции. Анализ причин отсутствия реакции составляет заключительную часть третьей главы.

В заключении автор перечисляет основные результаты и выводы диссертационной работы.

Автореферат правильно отражает содержание диссертации.

Замечания по диссертационной работе.

1. Приведенные в Таблице 5 параметры элементарных ячеек близки к параметрам, приемлемым для тригональной и гексагональной сингоний. Следует заметить, что стартовая структура 3O6V, использованная в методе молекулярного замещения, была решена в тригональной пространственной группе. Тем не менее, автор определяет группы кристаллографических симметрий для исследованных комплексов как P1 либо P2₁. Хотелось бы видеть в диссертации пояснение причин такого выбора.

2. Семь исследованных структур комплексов уридинфосфорилазы VchUPh были решены методом молекулярного замещения, стартуя с известной структуры нативного белка 3O6V. Процесс решения структур комплексов описан автором предельно кратко и вызывает ряд вопросов:

- Что использовалось в качестве стартовой модели при поиске (мономер, димер, гексамер)?

- Главная цепь использованной для поиска модели хорошо совпадает с главными цепями структур, определенных в данной работе. Для чего понадобилось варьировать ряд параметров при использовании метода молекулярного замещения? При таком хорошем совпадении стартовой модели и полученных финальных моделей программы метода молекулярного замещения, как правило, находят решения с хорошим контрастом в широком диапазоне параметров.

3. Правая колонка Таблицы 7, по-видимому, не заполнена. Если речь идет о контактах остатков соседствующих в кристалле гексамеров, то оператор симметрии должен иметь ненулевую трансляционную компоненту. Аналогичное замечание относится и к Таблице 8.

4. Диссертация, в целом, хорошо иллюстрирована рисунками и таблицами, однако в некоторых разделах была бы полезна дополнительная информация. Так в разделе 1.6.2 - "Описание сайта связывания уридинфосфорилазы" – на двух страницах идет чисто словесное описание структуры сайта. Наличие рисунка в этом месте сильно упростило бы понимание текста. Также было бы полезным включение в Таблицу 5 ("Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов") показателя качества дифракционного набора R_{merge} .

5. Хотя, в целом, диссертация написана достаточно ясно и понятно, автору не удалось избежать ряда грамматических ошибок, жаргонных фраз и описок. Иногда такие описки искажают смысл текста. Например, подписи к Таблицам 7 и 8 гласят: "Контакты между гомодимерами, связанные кристаллографической симметрией, ...". Речь же идет, по-видимому, о связи симметрией гомодимеров, а не контактов. Другой пример: в разделе 1.4.1 автор указывает, что присутствие уридина понижает токсичность используемого в химиотерапии рака препарата 5-ФУ без снижения его противоопухолевой активности, но пишет далее, что "ингибирование активности УФ является привлекательный терапевтической стратегией для **сохранения** токсичности 5-ФУ".

Сделанные критические замечания не изменяют общей положительной оценки проведенного диссертантом исследования.

Заключение. Диссертационная работа Прокофьева Игоря Игоревича «Селективность пиримидинфосфорилазы холерного вибриона к природным нуклеозидам и ксенобиотикам по результатам рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования биомакромолекулярных комплексов» является законченным научным исследованием, выполненным на высоком уровне. В работе были успешно решены поставленные задачи. Результаты работы доложены на нескольких международных научных конференциях, представлены в четырех статьях в журналах из списка ВАК. Содержание диссертации в полной мере отражено в публикациях. Диссертационная работа Прокофьева И.И. отвечает требованиям раздела II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – **Прокофьев Игорь Игоревич заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «кристаллография, физика кристаллов».**

Материалы диссертации Прокофьева Игоря Игоревича заслушаны и одобрены на заседании научного семинара ИМПБ РАН – филиала ИПМ им. М.В. Келдыша РАН 24 мая 2017 года.

Старший научный сотрудник Лаборатории Кристаллографии макромолекул
к.ф.-м.н.

Петрова Т.Е.

29 мая 2017 г.

Заведующий Лабораторией молекулярной динамики
к.ф.-м.н., ст.н.с.

Балабаев Н.К.

29 мая 2017 г.

Руководитель Института математических проблем биологии РАН -
филиала ФИЦ ИПМ им.М.В.Келдыша РАН
д.ф.-м.н., доцент

Устинин М.Н.

29 мая 2017 г.

Подписи, Петровой Т.Е., Балабаева Н.К. и Устинина М.Н. заверяю:
Начальник ОК филиала



/Галушко Т.А./

29.05.2017

Петрова Татьяна Евгеньевна - к.ф.-м.н., ст.н.с. Лаборатории кристаллографии макромолекул ИМПБ РАН – филиала ИПМ им. М.В.Келдыша РАН, 142290, г.Пушино, ул. Профессора Виткевича, д.1, Тел. 8(4967)318545, e-mail: tania.petrova.ru@gmail.com

Балабаев Николай Кириллович – к.ф.-м.н., ст.н.с., заведующий Лабораторией молекулярной динамики ИМПБ РАН – филиала ИПМ им. М.В.Келдыша РАН, 142290, г.Пушино, ул. Профессора Виткевича, д.1, Тел. 8(4967)318517, e-mail: balabaev@psn.ru

Устинин Михаил Николаевич – д.ф.-м.н., доцент, руководитель Института математических проблем биологии РАН – филиала ФИЦ "Институт прикладной математики им. М.В.Келдыша РАН", 142290, г.Пушино, ул. Профессора Виткевича, д.1, Тел. 8(4967)318502, e-mail: ustinin@impb.ru