

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.228.03  
(Д 003.075.04), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРАСНОЯРСКИЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК» (ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН),  
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 30.01.2024 № 2

О присуждении Суковатому Льву Алексеевичу, гражданину России, учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Молекулярно-динамический анализ влияния осмолитов на структуру бактериальных люцифераз» по специальности 1.5.2. Биофизика, принята к защите 17.11.2023 (протокол заседания № 12) диссертационным советом 24.1.228.03 (Д 003.075.04), созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН), Министерство науки и высшего образования РФ, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, создан приказом Минобрнауки № 21/нк от 24.01.2017.

Соискатель Суковатый Лев Алексеевич 30.06.1995 года рождения. В 2016 году соискатель окончил бакалавриат Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство образования и науки РФ, по направлению подготовки 03.03.02 Физика, присуждена квалификация Бакалавр; в 2018 году окончил с отличием очную

магистратуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство образования и науки РФ, по направлению подготовки 03.04.02 Физика, присуждена квалификация Магистр; в 2022 году окончил очную аспирантуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство науки и высшего образования РФ, по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки, присуждена квалификация «Исследователь. Преподаватель-исследователь», работает ассистентом кафедры биофизики, а также инженером-исследователем в лаборатории биолюминесцентных биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство науки и высшего образования РФ.

Диссертация выполнена на кафедре биофизики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство науки и высшего образования РФ.

Научный руководитель – кандидат физико-математических наук, Немцева Елена Владимировна, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), лаборатория биолюминесцентных биотехнологий, старший научный сотрудник, кафедра биофизики, доцент.

Официальные оппоненты:

Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ им. М.В. Ломоносова), кафедра биофизики биологического факультета, профессор;

Седов Игорь Алексеевич, доктор химических наук, доцент, Федеральное

государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет (КФУ), Химический институт им. А.М. Бутлерова, ведущий научный сотрудник дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН), г. Пушкино Московской области, в своем положительном отзыве, подписанном Кондратьевым Максимом Сергеевичем, кандидат физико-математических наук, лаборатория структуры и динамики биомолекулярных систем, заведующий лабораторией, указала, что решаемая соискателем научная задача по выявлению молекулярных механизмов воздействия природных осмолитов на функциональные характеристики ферментов имеет значение для понимания жизненно важных процессов, лежащих в основе клеточного метаболизма, диссертационная работа актуальна как по тематике, так и по методологической части и подходам, диссертация соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликованы 13 работ, из них в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы цитирований Scopus, Web of Science опубликовано 8 работ, а также 5 публикаций в сборниках докладов научных конференций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, объем научных изданий (статей) составляет 111 стр., авторский вклад – 75%.

Наиболее значимые публикации:

1. Лисица А.Е. Вязкие среды замедляют распад ключевого интермедиата биолюминесцентной реакции бактерий / А.Е. Лисица, **Л.А. Суковатый**, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева // Доклады Российской академии наук. Науки о

жизни, 2020. Т. 492(1), С. 320-324. (Lisitsa A. Viscous media slow down the decay of the key intermediate in bacterial bioluminescent reaction / A. Lisitsa, **L. Sukovatyi**, V. Kratasyuk, E. Nemtseva // Doklady Biochemistry and Biophysics. – Pleiades Publishing, 2020. V. 492(1), P. 162-165).

2. **Суковатый Л.А.** Влияние осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты / Л.А. Суковатый, А.Е. Лисица, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева // Биофизика, 2020. Т. 65(6), С. 1135-1141. (**Sukovatyi L.A.** The effect of osmolytes on the bioluminescent reaction of bacteria: structural and dynamic properties / L.A. Sukovatyi, A.E. Lisitsa, V.A. Kratasyuk, E.V. Nemtseva // Biophysics, 2020. V. 65(6), P. 966-971).

3. Lisitsa A. Mechanisms of viscous media effects on elementary steps of bacterial bioluminescent reaction / A. Lisitsa, **L. Sukovatyi**, S. Bartsev, A. Deeva, V. Kratasyuk, E. Nemtseva // International journal of molecular sciences, 2021. V. 22(16), 8827.

4. Nemtseva E.V. Bacterial luciferases from *Vibrio harveyi* and *Photobacterium leiognathi* demonstrate different conformational stability as detected by time-resolved fluorescence spectroscopy / E. Nemtseva, D. Gulnov, M. Gerasimova, **L. Sukovatyi**, L. Burakova, N. Karuzina, B. Melnik, V. Kratasyuk // International journal of molecular sciences, 2021. V. 22(19), 10449.

5. Deeva A. Structure-function relationships in temperature effects on bacterial luciferases: nothing is perfect / A. Deeva, A. Lisitsa, **L. Sukovatyi**, T. Melnik, V. Kratasyuk, E. Nemtseva // International journal of molecular sciences, 2022. V. 23(15), 8119.

6. Gulnov D. Effect of viscous media on the photophysical characteristics of flavin mononucleotide / D. Gulnov, M. Gerasimova, **L. Sukovatyi**, E. Nemtseva // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics, 2022. V. 86(10), P. 1196-1202.

7. Lisitsa A. The role of cosolvent–water interactions in effects of the media on functionality of enzymes: a case study of *Photobacterium leiognathi* luciferase / A. Lisitsa, **L. Sukovatyi**, A. Deeva, D. Gulnov, E. Esimbekova, E. Nemtseva, V. Kratasyuk // Life, 2023. V. 13(6), 1384.

8. Sutormin O. Coupling of NAD(P)H: FMN-oxidoreductase and luciferase from luminous bacteria in a viscous medium: Finding the weakest link in the chain / O. Sutormin, E. Nemtseva, D. Gulnov, **L. Sukovatyi**, Y. Tyrtysnaya, A. Lisitsa, V. Kratasyuk // Photochemistry and Photobiology, 2023. doi:10.1111/php.13845.

На диссертацию и автореферат поступило 7 отзывов. Все отзывы положительные. Отзывы: доктора биологических наук Чеботаревой Н.А., ведущего научного сотрудника лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН); доктора биологических наук, профессора Артюхова В.Г., заведующего кафедрой биофизики и биотехнологий медико-биологического факультета и кандидата биологических наук Шиловой Е.В., ассистента кафедры биофизики и биотехнологий медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» (ВГУ); доктора физико-математических наук Мельника Б.С., главного научного сотрудника, руководителя группы спектроскопии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук (ИБК РАН); кандидата физико-математических наук Зелепуга Е.А., старшего научного сотрудника лаборатории химии пептидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН им. Г.Б. Елякова) замечаний не содержат. В отзыве кандидата биологических наук Букина Ю.С., старшего научного сотрудника лаборатории геносистематики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН) Букина содержатся следующие замечания и вопросы: «Не совсем понятна формулировка 5 задачи: во фразе автора “люциферазы двух подсемейств (из *P. leiognathi* и *V. harveyi*)” слово

подсемейство относится к таксономии изучаемых видов бактерий или к подсемействам белковых молекул? Структура люциферазы *P. leiognathi* восстанавливалась по первичной аминокислотной последовательности, при этом в автореферате не указано, из какой базы данных была взята эта первичная аминокислотная последовательность. В базе данных NCBI, например, на момент написания отзыва на автореферат имеется информация о 113 расшифрованных полных геномах различных штаммов и подвигов *P. leiognathi*. В отзыве кандидата физико-математических наук Швецова А.В., старшего научного сотрудника группы вычислительных и нейтронно-синхротронных методов структурной биологии лаборатории молекулярной биофизики и нейтронных исследований отдела молекулярной и радиационной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (ПИЯФ - НИЦ «Курчатовский институт») приведены следующие замечания: «В работе не указаны модель молекулы воды, а также какая концентрация ионов была использована для создания ионной силы в моделируемой системе, что может оказывать существенное влияние на поведение белков. Немаловажным фактором при проведении расчётов молекулярной динамики белков является их зарядовое состояние в системе, особенно в случае наличия на них групп способных изменять заряд в зависимости от pH». В отзыве доктора биологических наук Набатова А.А., доцента кафедры биохимии и клинико-лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (КазГМУ) отмечено следующее замечание: «Практическая значимость исследования немного снижается из-за отсутствия биологических экспериментов с использованными люциферазами. Хочется надеяться, что такие эксперименты, непростые по уровню сложности, будут проведены в рамках развития данной работы».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается компетентностью и высокой квалификацией специалистов в области ферментативного катализа, структурной биологии, молекулярного моделирования, а также соответствием основных направлений исследований задачам диссертационной работы Суковатого Л.А. Исследовательский коллектив лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем Института биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН) ФИЦ ПНЦБИ РАН занимается изучением структурно-динамических характеристик белков методами молекулярной динамики, сходными с представленными в диссертации методами. Доктор биологических наук, профессор Максимов Г.В. (г. Москва), является профессором кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, имеет публикации, охватывающие широкий спектр тем, включая исследование структуры ферментов в средах с различными физико-химическими характеристиками с помощью разнообразных экспериментальных методов. Доктор химических наук, доцент Седов И.А. (г. Казань), ведущий научный сотрудник Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ, является специалистом в области молекулярного моделирования сред сложного состава, тем самым, область его компетенции существенно перекликается с научной проблемой, в рамках которой выполнена диссертация.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**разработана** новая научная идея, обогащающая научную концепцию о механизмах влияния осмолитов на каталитическую активность бактериальной люциферазы *Photobacterium leiognathi*;

**предложена** научная гипотеза о связи активности бактериальной люциферазы в присутствии осмолитов различной природы с доступностью активного центра фермента для молекул окружения;

**доказана** связь между сохранением активности бактериальных люцифераз в присутствии сахарозы и стабилизацией мобильной петли фермента;

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**доказана** связь между размером молекул осмолита и скоростью биолюминесцентной реакции бактерий;

**применительно к проблематике диссертации результативно использован** метод молекулярной динамики, позволяющий анализировать полноатомную модель структуры бактериальной люциферазы в средах с осмолитами;

**изложены** механизмы влияния осмолитов на структуру двух гомологичных бактериальных люцифераз и приведены корреляции с изменением кинетических параметров биолюминесцентной реакции;

**раскрыто** ранее неизвестное специфичное влияние осмолитов различной природы на каталитически важные элементы структуры бактериальных люцифераз;

**изучены** характеристики ранее нерасшифрованной пространственной структуры люциферазы *Photobacterium leiognathi*, проведено её сравнение с разрешённой кристаллической структурной люциферазы *Vibrio harveyi*.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**определены** молекулярные механизмы, влияющие на каталитическую активность бактериальных люцифераз в средах сложного состава, что может быть использовано при дизайне биоаналитических методов и интерпретации полученных с их помощью результатов;

**создана** модель пространственной структуры активного центра бактериальных люцифераз двух подсемейств, что может быть использовано для предсказания чувствительности биоаналитических методов на их основе к разным классам химических соединений.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

**теория** влияния осмолитов на структурную стабильность и функциональную активность белков путём взаимодействия молекул осмолитов с их поверхностью, использованная в работе, согласуется с последними опубликованными исследованиями других авторов.



**использованы** разработанные в последние годы подходы для изучения влияния осмолитов на структурно-динамические характеристики белков методами *in silico* и *in vitro*;

**установлено** совпадение результатов автора по концентрационным зависимостям коэффициентов предпочтительного взаимодействия осмолитов с бактериальными люциферазами с результатами из независимых источников научной информации по данной тематике;

**использованы** известные обновляемые программные пакеты для обработки и анализа молекулярно-динамических траекторий белков в окружении сред сложного состава (GROMACS, VMD, MDAnalysis).

**Личный вклад соискателя состоит** в участии в формулировании цели и задач исследования, выборе программных средств для проведения вычислительных экспериментов и анализа результатов, подготовке модельных систем и проведении экспериментов, интерпретации полученных данных, апробации результатов исследования на научных конференциях и подготовке публикаций.

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний, относящихся к сути диссертации, однако был задан ряд вопросов: чем подтверждается достоверность результатов полученных на основе разработанной системы; как можно экстраполировать полученные результаты на клеточные процессы; можно ли говорить о влиянии осмолитов на параметры (тушение) билюминесцентных реакций как об ограничении для их использования в качестве токсикологических тестов; как можно сформулировать соответствие количественной части вашей работы отрасли физико-математические науки; с чем связаны колебания функции MDDF для воды, достоверны ли неожиданные эффекты, не являются ли они артефактами; с чем связано отличие функции распределения для воды от аналогичных функций для осмолитов; как можно объяснить изменение тренда зависимости коэффициента MDDF от концентрации сахарозы, в частности наличие спада; как влияет тип осмолита на количество воды в полости активного центра; какова причина появления еще одного участка, похожего

на участок мобильной петли, на зависимости  $\Delta\text{RMSF}$  (среднеквадратичной флуктуации атомов) C $\alpha$ -атомов люциферазы; что понимается под терминами первый и второй гидратный слой на зависимости MDDF.

Соискатель Суковатый Л. А. согласился с замечаниями и ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы, в частности: достоверность полученных результатов подтверждается высокими стандартами валидации результатов используемых программных пакетов и силовых полей, для исключения локальных минимумов в структурах использовали не менее трех независимых запусков расчетов со всеми этапами релаксации и минимизации; использование осмолитов предоставляет возможность моделирования условий *in vitro*, приближенных к внутриклеточным, регистрирование биохимических реакций проходит в условиях близких к *in vivo*; осмолиты могут нарушать связывание с субстратом реакции в активном центре люцифераз (глицерин) и влиять на структуру белковой глобулы (этиленгликоль), что приводит к некоторым ограничениям использования люминесцентных реакций в качестве токсикологических тестов; использованы методы молекулярной динамики, которые основаны на уравнениях Ньютона, силовые поля получены из экспериментальных результатов ЯМР; возникновение колебаний функции MDDF для воды связано с тем, что люцифераза обладает вытянутой (нешарообразной) формой белка, первый пик на зависимости MDDF обозначает первый гидратный слой на расстоянии 1,8 Å от поверхности белка, второй пик – второй слой на расстоянии 2.7 Å; отличие функции распределения для воды от аналогичных функций для осмолитов связано с тем, что белковая глобула люциферазы обладает вытянутой формой и используемым в вычислениях размером бокса; спад зависимости коэффициента MDDF с повышением концентрации сахарозы согласуется с публикациями других авторов и объясняется уменьшением количества областей связывания на поверхности белка из-за сложного рельефа белковой глобулы, а также кластеризацией осмолитов; проникновение в полость и исключение молекул воды связано с размером и типом осмолита; изменение  $\Delta\text{RMSF}$ , аналогичное участку

мобильной петли, получено для ранее неизученного участка полипептидной цепи, и требует дальнейшего исследования; на первом гидратном слое отсутствуют ван-дер-ваальсовские ограничения, как со стороны молекул белка, так и со стороны молекул осмолитов, и находятся атомы водорода, на втором гидратном слое – находятся атомы кислорода, использование MDDF (функции распределения минимальной дистанции) между атомами люциферазы и воды позволяет получить гидратную оболочку более правильной формы.

На заседании **30 января 2024 года** диссертационный совет принял решение: за решение научной задачи, направленной на выявление механизмов влияния природных осмолитов на структурно-функциональные связи ферментов, имеющей существенное значение для развития молекулярной биофизики, присудить **Суковатому Л.А.** ученую степень кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

При проведении тайного голосования с использованием информационно-коммуникационных технологий диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 5 докторов наук по специальности 1.5.2. Биофизика отрасли физико-математические науки, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – **18**, против – **0**.

Заместитель председателя  
диссертационного совета, д.ф.н.



Барцев Сергей Игоревич

Учёный секретарь  
диссертационного совета, к.б.н.

Дементьев Дмитрий Владимирович

01.02.2024