

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию А.В. Головина
"Конформационная динамика нуклеиновых кислот при взаимодействии с
лигандами", представленную на соискание ученой степени доктора химических
наук по специальностям 02.00.10 – биоорганическая химия**

Одним из наиболее активно развиваемых направлений в молекулярной биологии в постгеномную эру является молекулярно-динамическое моделирование биополимеров. Современные расчетные методы дают возможность охарактеризовать весь спектр пространственных структур биообъектов, провести кластеризацию разрешенных конформаций, проследить их изменение во времени или в процессе взаимодействия с другими молекулами, определить потенциальные сайты связывания с лигандами различной природы, рассчитать энергию комплексообразования.

Диссертационная работа А.В. Головина посвящена разработке методов молекулярного моделирования и применению найденных алгоритмов и подходов к описанию различных по размеру и сложности систем, в которых ключевую роль играют нуклеиновые кислоты (НК). Использование вычислительных методов вместе с творческим осмыслением полученных результатов позволили диссертанту прояснить ряд важных аспектов, связанных со структурной характеристикой и динамикой супрамолекулярных белково-нуклеиновых комплексов, которые до этой работы либо не рассматривались, либо были неясны из-за противоречивых экспериментальных данных. Диссертационная работа А.В. Головина состоит из трех относительно независимых частей, различающихся как объектами исследования, так и спектром решаемых задач и уровнем моделирования.

В первой части разработаны методы, которые позволили определить расположение и структурную организацию тмРНК в комплексе с рибосомой на разных этапах трансляции. Полученные теоретические модели хорошо коррелировали с экспериментальными данными по химической модификации и криоэлектронной микроскопии. Ключевым фактором, который позволил использовать упрощенные модели при сохранении точности моделирования, было введение пространственных ограничений с фиксацией двух функциональных участков тмРНК на рибосоме.

Во второй части работы с помощью полноатомного моделирования комплексов 23S рРНК с антибиотиками-макролидами был выявлен новый сайт нековалентного взаимодействия остова растущего пептида с поверхностью рибосомного туннеля, предсказана ингибирующая активность производных тилозина, которые связываются в рибосомном туннеле *E.coli*. Впервые показано, что эффективность ингибирования элонгации трансляции связана с образованием сети водородных связей, которые

закрепляют альдегидную группу лактонного кольца антибиотика в положении, благоприятном для образования ковалентной связи с функциональными группами оснований рРНК. При моделировании использован подход, в рамках которого конформационное пространство оценивалось только внутри кубика, окружающего интересующую область; вне этого кубика атомы рибосомы подвергались позиционным ограничениям, то есть, их движение было запрещено. Кубическое, а не ранее использованное сферическое окружение позволило более адекватно воспроизводить электростатические взаимодействия, характерные для рибосомы, минимизируя количество воды в системе.

Наиболее ярко стратегия исследований, проведенных А.В. Головиным, иллюстрируется многоплановой работой по изучению структурного профиля и динамики небольших молекул ДНК - G-квадруплексов (G_4). В ряду неканонических форм ДНК, активно изучаемых в последние десятилетия, G-квадруплексы занимают особое место. Это в первую очередь связано с тем, что G_4 - единственная неканоническая структура, образование которой в живой клетке было строго доказано. G-квадруплексы играют важную биологическую роль, специфически связываясь с клеточными белками, и рассматриваются как мишени низкомолекулярных лигандов (потенциальных противоопухолевых средств), влияющих на уровень генной экспрессии. Сложность экспериментального изучения G_4 заключается в структурном многообразии этой формы, возможности сосуществования различных квадруплексных конформаций и перехода одной в другую при изменении внешних условий. Показано, что идентифицированные *in vitro* вторичные структуры, образованные определенными G_4 -мотивами, различаются в зависимости от метода исследования. Более того, самый информативный для других биообъектов метод рентгеноструктурного анализа (РСА), как оказалось, не отражает реальную структуру G_4 , которая реализуется в физиологических условиях; это связано с обезвоживанием образца при кристаллизации, способствующем конформационному сдвигу к G_4 параллельной топологии. В связи с этим, расчетные методы, позволяющие охарактеризовать структуру и динамику таких необычных форм ДНК, приобретают особое значение.

В этой части работы наиболее важными представляются следующие достижения диссертанта.

С помощью моделирования молекулярной динамики охарактеризованы все G_4 , присутствующие в базах данных; проведен анализ влияния нуклеотидных остатков в петлях квадруплекса на стабильность структуры; определены значения углов спирального вращения G-квартетов друг относительно друга во внутримолекулярных квадруплексах в

зависимости от типа петель, и в беспетлевых тетрамолекулярных G_4 . Особое внимание уделено изучению конформационной динамики минимального аптамера к тромбину – 15-ТВА, который существует в виде внутримолекулярного G-квадруплекса, стабилизированного двумя G-квартетами и тремя латеральными петлями. Используя разные стартовые конформации (ЯМР и РСА), автор показал, что при моделировании на длинных траекториях устойчивой является только квадруплексная структура, охарактеризованная методом ЯМР-спектроскопии. Были установлены Н-связи между основаниями петель, стэкинг-взаимодействия между гуанинами «верхнего» квартета и гетероциклами петель и др. Следует отметить, что в данной работе время наблюдения за эволюцией структуры на 1-2 порядка превосходило ранее использованное, что значительно повышало достоверность результатов.

Диссертантом детально исследована координация катионов (K^+ , Na^+ , Ba^{+2}) в 15-ТВА и механизм проникновения катиона в внутреннюю полость квадруплекса, который зависит от природы иона металла. Представлена атомистическая картина взаимодействия катионов с аптамером с использованием двух вариантов моделирования – молекулярная динамика в явно заданном растворителе (>30 траекторий) и гибридного метода – молекулярная динамика/квантовая механика, подтвержденных данными изотермической калориметрии. Показано, что катионы не являются инициаторами сборки G_4 , а стабилизируют уже сформированную квадруплексную структуру; оценено время удерживания катиона в разных сайтах связывания и конформационные изменения, в частности расстояния между остатками гуанина в G-квартетах, сопровождающие движение катиона в полость квадруплекса. Эти данные могут быть справедливыми и для G_4 других топологий.

Кроме серьезной фундаментальной составляющей в работе А.В. Головина есть и прикладной аспект, связанный с использованием охарактеризованных квадруплексных конструкций. Так, было показано, что эффективность связывания аптамера 15-ТВА с тромбином обратно пропорциональна стабильности G_4 . То есть, для образования функционального белково-нуклеинового комплекса должна сохраняться конформационная подвижность аптамера. Полученные данные о структурной динамике 15-ТВА и особенностях его комплексообразования с тромбином легли в основу создания сенсоров на основе углеродных нанотрубок для определения концентрации этого белка. Методами молекулярной динамики было изучено изменение вторичной структуры 15-ТВА в зависимости от способа и условий конъюгации с нанотрубками. Оказалось, что иммобилизованный аптамер распластан на поверхности носителя, но при добавлении тромбина конформационное равновесие смещается в сторону образования

квадруплексной структуры; белок, действуя как шаперон, структурирует ДНК-аптамер для эффективного связывания с ним.

Обзор литературы является необходимой вводной частью к работе. В нем отражены задачи и проблемы моделирования биополимеров, приведены характеристики разных уровней моделирования. Расчетные методы рассматриваются в качестве альтернативного инструмента в дополнение к экспериментальным подходам. Особое внимание уделено точной оценке возможностей и ограничений теоретических моделей, а также поиску ошибок, которые могут появиться при анализе крупных супрамолекулярных комплексов, к которым применена процедура «огрубления», при которой несколько степеней свободы частицы объединяются в одну. Отдельная часть обзора посвящена описанию структурной биоинформатики нуклеиновых кислот. К сожалению, в этом разделе много неточностей и фактических ошибок: даны неверные определения N- и S-конформаций сахарных остатков, не указано, какие нуклеотидные последовательности образуют Z-форму ДНК, и др.

Продолжая критическую ноту, хочу высказать замечания дискуссионного характера и отметить ряд ошибок и неточностей в тексте диссертации.

1. Непонятно, почему для классификации G_4 А.В. Головин выбрал два параметра - угол спирального вращения G-квartetов и их планарность. Ведь эти параметры взаимосвязаны с другими топологическими характеристиками G-квадруплексов: ориентацией цепей, типом петель, количеством молекул, образующих G_4 , и имеют смысл только при учете всех переменных.

2. Для характеристики роли петель в структуре G_4 автор рассматривал наряду с реальным 15-ТВА двухквartetный квадруплекс без петель. На мой взгляд, это неадекватная модель, т.к. внутримолекулярная квадруплексная структура аптамера искусственно подменяется межмолекулярной с совершенно иными термодинамическими характеристиками. Результат моделирования как раз и подтвердил ее нежизнеспособность.

3. Выводы диссертации носят слишком общий характер. Они нечетко сформулированы и не отражают подлинных находок и достижений автора, описанных в работе.

4. Хотя диссертация изложена хорошим литературным языком, текст изобилует опечатками, синтаксическими ошибками; встречается пропуск слов, повторение абзацев, недописанные фразы, например на стр. 132, 149, 157, 161, 229. Много погрешностей и в списке литературы, небрежно и с ошибками оформлены рисунки 3.14, 3.16, 3.29, 3.46 и др.

5. Из мелких ошибок можно отметить следующее:

- указано, что петли пропеллерного типа обращают ход цепи ДНК (стр. 114), хотя, наоборот, они единственные из всех петель G-квадруплекса не изменяют направление хода цепей в квадруплексном коре;

- все канонические и неканонические формы нуклеиновых кислот, включая G₄ - это элементы вторичной, а не третичной структуры, как написано автором (автореферат);

- неудачное выражение - угол закрутки малой бороздки;

- написано – имидиты, вместо амидофосфиты (стр. 213).

Хотя отмеченные недостатки несколько снижают общее впечатление от работы А.В. Головина, главным в ней является то, что автор, опираясь на глубокий анализ методов молекулярного моделирования, развил приоритетное и перспективное направление в области структуры биополимеров. Высокий творческий потенциал автора, широкий диапазон исследований - такое впечатление остается после ознакомления с работой А.В. Головина. Полученная им информация является исключительно важной для прогнозирования дальнейших экспериментальных исследований белково-нуклеиновых комплексов разного уровня сложности. Заложенный в НК структурный полиморфизм, проходящий красной нитью через всю работу А.В. Головина, открывает новые практические перспективы в плане медицинской диагностики и создания нового поколения лекарств.

Автореферат диссертации достаточно полно отражает ее содержание.

По актуальности, новизне, количеству и качеству достигнутых результатов диссертационная работа А.В. Головина соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук.

Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник
Химического факультета Федерального
государственного образовательного учреждения
высшего профессионального образования «Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Н.Г. Долинная

2 июня 2014

Личную подпись
ЗАВЕРЯЮ:
Нач. отдела делопроизводства
химического факультета

