

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ИМБ РАН

академик, д.б.н., проф.



А.А. Макаров

" 2 " июня 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

о диссертационной работе

Головина Андрея Викторовича

“Конформационная динамика нуклеиновых кислот при взаимодействии с лигандами”,
представленной на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности
02.00.10 — биорганическая химия.

Диссертационная работа Головина Андрея Викторовича посвящена разработке нового направления в области биорганической химии, связанного с анализом структуры и динамики нуклеиновых кислот и их комплексов с лигандами. Актуальность проблемы обусловлена растущим потенциалом использования нуклеиновых кислот в качестве мишеней для разработки нового поколения лекарственных средств и применением нуклеиновых кислот в качестве агентов, эффективно действующих на активность некоторых ферментов.

Практическая значимость работы Головина А.В. заключается в том, что автором на основе фундаментальных исследований динамики структуры квадруплексных ДНК предложен новый прототип лекарственного средства на основе ДНК-аптамера RA-36, способного ингибировать активность тромбина. В настоящее время проводятся доклинические испытания этого лекарственного средства. Опираясь на фундаментальные исследования, А.В. Головин и соавторы предложили новый сенсор на основе углеродных нанотрубок и ДНК аптамера для определения концентрации тромбина в жидкостях. В работе предложен механизм работы такого сенсора, что позволяет использовать наработки автора для создания сенсоров к другим белкам.

Актуальность работы обусловлена тем, что поиск и изучение набора неканонических структур нуклеиновых кислот в комплексах с белками и низкомолекулярными лигандами важны для понимания механизма функционирования сложных комплексов белков с нуклеиновыми кислотами. Понимание этих механизмов важно для рационального конструирования и поиска новых лекарственных средств,

способных эффективно влиять на активность ключевых белково-нуклеиновых комплексов.

Работа состоит из четырёх глав и выводов. Она изложена на 317 страницах текста, включая список литературы, состоящий из 416 источников, содержит 79 рисунков и 11 таблиц. Формулировка проблемы исследования приведена автором во введении. Там же приведены основные задачи диссертации. Во второй главе приведён обзор литературы, в котором обсуждены современные задачи и проблемы моделирования структуры биополимеров, систематизированы данные о роли сахара-фосфатного остова при формировании структуры нуклеиновых кислот, обсуждены основные проблемы моделирования конформационной динамики G-квадруплексов, а также основные достижения в этой области.

Основные результаты диссертационной работы и их обсуждение изложены в третьей главе. Следует особо отметить раздел, посвященный моделированию связывания макролидных антибиотиков тилозиновой группы и их аналогов в рибосомном тоннеле в непосредственной близости от пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) рибосомы. Установление трехмерной структуры рибосомы и последующие исследования структуры комплексов рибосомы с макролидными антибиотиками показали, что рибосомный тоннель является перспективной платформой для создания новых лекарственных агентов – эффективных ингибиторов белкового синтеза. Антибиотик тилозин и его аналоги не ингибируют непосредственно образование пептидной связи в ПТЦ. Они блокируют выход растущей пептидной цепи в рибосомный тоннель. А.В. Головин и соавторы впервые провели компьютерное моделирование связывания макролидных антибиотиков в рибосомном тоннеле, включая анализ связывания новых аналогов тилозина, синтезированных А.А. Богдановым и сотрудниками. В тилозине и его аналогах пептидная часть моделирует растущую пептидную цепь, в то время как лактонный и сахарные циклы антибиотика взаимодействуют с различными группами в ПТЦ и рибосомном тоннеле. В комплексе тилозина с рибосомой образуется ковалентная связь между аминогруппой остатка аденина A2062 в рибосомной РНК и альдегидной группой лактонного кольца антибиотика. А.В. Головин и соавторы провели исследования молекулярной динамики связывания пептидных производных тилозина с рибосомным тоннелем.

В качестве первого шага авторы исследовали динамику образования комплекса тилозина с 23S РНК. Структура этого комплекса установлена с помощью рентгеноструктурного анализа. В качестве параметра, характеризующего положение лактонного кольца антибиотика, авторы использовали среднеквадратичное смещение лактонного кольца (MSD) относительно начального положения. Представляют значительный интерес данные автора о том, что связывание Вос- γ -аминобутирил-ОМТ и ОМТ (ОМТ - 5-О-микаминозилтилонолид) характеризуются значительно большими значениями MSD и обладают значительно меньшей способностью ингибировать трансляцию *in vitro* по сравнению с Вос-Gly-ОМТ производным. Замена Вос-группы на формильную группу не приводит к изменению активности.

Оригинальным моментом диссертационной работы А.В. Головина является построение модели для супрамолекулярных комплексов тмРНК с рибосомой. Известно, что тмРНК содержит тРНК-подобный домен, а также фрагмент, который соответствуют

мРНК. тмРНК взаимодействует с рибосомой в процессе транс-трансляции и способствует сохранению рибосомы в активном состоянии при остановке процесса трансляции в том случае, когда мРНК содержит ошибки. А.В. Головину удалось построить модель связывания тмРНК с рибосомой, которая согласуется с данными криоэлектронной микроскопии.

Значительная часть диссертационной работы А.В. Головина посвящена исследованию конформационных особенностей квадруплексных ДНК и исследованию структурной динамики аптамера 15-ТВА и его комплексов с ионами металлов и тромбином. Полученные результаты были использованы для конструирования прототипа нового лекарственного средства на основе G-квадруплексной ДНК и создания сенсоров, позволяющих определять концентрацию тромбина.

Работа Головина А.В. отличается *существенной научной новизной*. В ходе работы был предложен новый подход к компьютерному моделированию структуры больших супрамолекулярных комплексов, основанный на упрощённом представлении нуклеотидов и аминокислот. На основе разработанного подхода впервые были предложены структуры комплексов тмРНК с рибосомой на разных этапах элонгации трансляции. Последующие данные о структуре тмРНК, полученные экспериментально, подтвердили высокое качество моделирования. На основе результатов компьютерного моделирования, высказано предположение о том, что высокая эффективность ингибирования трансляции тилозиновыми производными связана с образованием водородных связей, которые позиционируют альдегидную группу лактонного кольца для эффективного формирования ковалентной связи. Эти подходы можно распространить для понимания механизмов действия пептидов TnaC и SecM, которые связываются в рибосомном тоннеле и ингибируют трансляцию.

Применение методов молекулярной динамики к минимальному 15-звенному ДНК квадруплексу впервые позволило продемонстрировать, что латеральные петли могут оказывать на квадруплекс как стабилизирующее, так и дестабилизирующее влияние, в зависимости от длины петель и последовательности нуклеотидов. Впервые показано, что произвольное направленное перемещение катиона металла в центральную полость квадруплекса является сложным процессом, который может проходить различными путями. Установлено, что эффективное хелатирование катионов в центре минимального 15-звенного квадруплекса определяется действием латеральных петель: подвижность петель уменьшает вероятность диссоциации комплекса с катионом.

Полученные результаты имеют не только фундаментальную научную ценность; но и практическую значимость. Они были использованы для создания нового соединения RA-36 с антитромботической активностью, построенного на основе ДНК-аптамера к тромбину. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* RA-36 показал высокую биологическую активность и низкую токсичность. Понимание структурной динамики аптамера при связывании с тромбином было использовано для создания сенсоров, позволяющих определять концентрацию тромбина.

Основные результаты по теме диссертации изложены в 16 печатных работ, 12 из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАК, и 4 являются патентами; результаты также опубликованы в 19 тезисах докладов.

Несмотря на высокий научный уровень работы А.В. Головина, в ней имеются недостатки. Встречаются опечатки и неудачные выражения. Встречаются нечёткие формулировки. Примером является нечеткая формулировка одной из задач диссертационной работы “Исследовать конформации G-квадруплексных ДНК и их зависимость от структурной организации молекулы”. Автор, вероятно, имел в виду поиск конформационных параметров, характеризующих ту или иную структуру. Термин «стабильность» в разных местах диссертации трактуется автором по-разному. При оценке «стабильности» водородных связей – используется вероятность нахождения пары атомов на подходящих расстояниях и соответствующих углах. При сравнении «стабильности» квадруплексных структур используются их геометрические параметры и степень их близости к параметрам для «идеальной» структуры, в то время как прямые данные о термодинамической стабильности этих структур не приводятся. «Стабильность» комплексов антибиотика тилозина и его аналогов в рибосомном тоннеле характеризуется величиной среднеквадратичного смещения лактонового кольца антибиотика от некоторого начального положения, что характеризует динамические характеристики процесса связывания, в то время как автор, несомненно, имеет энергетические характеристики комплексов, которые не приводятся.

Опечатки и ошибки, неудачные выражения. В предложении, выделенном автором в отдельный абзац (стр. 31) “Конформация сахаро-фосфатного остова описывается шестью торсионными углами: β шт, и χ ” Приводится 7 углов, один из которых χ описывает положение нуклеотида относительно сахарофосфатного остова. Рис 3.14 не представляет конформации квадруплекса 3+1, как утверждается. “Петля пропеллерного типа, обращающая ход полинуклеотидного тяжа в обратную сторону” (стр. 119). Данное утверждение неверно. Пропеллерная петля возвращает направление тяжа в сторону хода предыдущего сегмента.

Неудачные названия: “антибиотикотерапия” (стр 100), “антионкогенный препарат” (стр. 127), “константа аффинности” (стр. 207).

Несмотря на отмеченные недостатки работы, результаты, полученные А.В. Головиным, будут полезны не только исследователям, занимающимся структурной биологией нуклеиновых кислот, но и специалистам в других областях – молекулярной биофизики, медицинской химии, биоинформатики.

Общая оценка работы. Диссертация Головина А.В. является завершённым научным исследованием, посвящённым исследованию структуры и динамики нуклеиновых кислот при их взаимодействии с лигандами. Это исследование основано на компьютерном моделировании нуклеиновых кислот. Детальная информация о структуре нуклеиновых кислот, динамике и механизмах действия является крайне востребованной как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Так, например, показано, что увеличение “жесткости” структуры аптамера 15-ТВА приводит к уменьшению его способности ингибировать тромбин. Цель и задачи, сформулированные в работе,

достигнуты. Выводы и заключения, представленные автором, обоснованы и убедительно показывают новизну и применимость разработанных подходов.

Результаты работы могут быть использованы в естественнонаучных факультетах МГУ имени М.В. Ломоносова, СПбГУ, МФТИ и др.; в Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, в Институте органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, Институте биологии гена, Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, в научных учреждениях РАМН и др. Материал диссертационной работы может быть использован также и в образовательных учреждениях, в которых готовят специалистов по биоинформатике, биофизике, химии природных соединений и фармакологии.

Сделанные замечания не умаляют достоинств данной работы, которая, несомненно, представляет теоретический и практический интерес. Работа Головина А.В. выполнена на высоком научном уровне с использованием комплекса подходов молекулярного моделирования и структурной биологии и вносит существенный вклад в развитие биоорганической химии. Работа Головина А.В. отвечает требованиям к докторским диссертациям и соответствует пункту 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. № 842, а именно, в работе разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение. Автор работы - Головин Андрей Викторович, заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 — биоорганическая химия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании научного коллоквиума Лаборатории ДНК-белковых взаимодействий, Лаборатории вычислительных методов системной биологии и Лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений 2 июня 2014г (протокол №2).

Зав. лабораторией ДНК-белковых взаимодействий, ИМБ РАН,

д.ф.-м.н., проф., чл.-корр. РАН, Г.В. Гурский

г. Москва, 119991, ул. Вавилова, 32.

Тел (499)135-97-90

e-mail: gursky@eimb.ru