



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертации Головина Андрея Викторовича
«Конформационная динамика нуклеиновых кислот при взаимодействии с лигандами»,
представленной на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности
02.00.10 – «биоорганическая химия».

В настоящее время методы вычислительного эксперимента широко применяются практически во всех областях науки и техники, являясь равноправным партнером традиционных экспериментальных подходов. В частности, в молекулярной биофизике и структурной биологии огромную роль играют методы компьютерного моделирования структуры и динамики сложных надмолекулярных систем, таких, например, как олигомерные белки. Поэтому совсем не случайно, что Нобелевская премия по химии в 2013 г. была присуждена за работы по созданию и применению именно таких подходов. Получаемая в расчетах информация необходима для детального понимания на атомном уровне физических механизмов работы биологических макромолекул. Решение данной задачи создает основу для дальнейшего рационального конструирования новых молекул с заданными физико-химическими свойствами и определенным спектром биологической активности. Это позволит, например, значительно ускорить процесс создания новых лекарств, их средств доставки и т.д. Серьезной преградой на пути развития данного направления является большой размер изучаемых систем (часто – до 10^6 атомов), что требует применения высокопроизводительных вычислений и/или согласованного применения моделей различного уровня детализации. В частности, в последние годы общепринятым и хорошо себя зарекомендовавшим стандартом при изучении сложнейших надмолекулярных биологических систем стало совместное использование приближений неявно заданных объектов (чаще всего – среды), т.н. «крупнозернистых» (coarse-grained), тяжелоатомных и полноатомных моделей. Кроме того, помимо классического описания в

рамках эмпирических силовых полей, отдельные элементы систем (например, активные центры ферментов и рецепторов) рассматривают с помощью гибридных методов молекулярной и квантовой механики. Достигнутый к настоящему времени прогресс на этом пути в основном связан с моделированием белков, биомембран и их комплексов. Работ же, посвященных многомасштабному компьютерному моделированию нуклеиновых кислот (НК), гораздо меньше, несмотря на то, что детальная информация об их структуре, динамике и механизмах действия является крайне востребованной как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. Диссертационная работа Головина А.В. посвящена созданию и применению высокоэффективных вычислительных подходов к молекулярно-динамическому моделированию ДНК и РНК в системах разного уровня сложности – от сравнительно коротких (~10 пар нуклеотидов) полимеров до надмолекулярных комплексов тмРНК с рибосомой. Это, несомненно, свидетельствует об актуальности темы диссертации.

Диссертация выполнена по «классической» схеме, изложена на 317 страницах и включает: Список сокращений, Введение (Глава 1), Обзор литературы (Глава 2), Результаты и обсуждение (Глава 3), Материалы и методы (Глава 4), Список литературы» (416 источников). Диссертация содержит 79 рисунков и 11 таблиц.

Во Введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, тезисно представлены основные результаты, описаны научная новизна и научно-практическая значимость работы. Глава 2 представляет собой литературный обзор, который затрагивает три основные тематики: 1) Общие задачи и проблемы моделирования биополимеров (Раздел 2.1); 2) Роль сахаро-фосфатного остова в формировании структуры НК (Раздел 2.2); 3) Моделирование молекулярной динамики (МД) G-квадруплексных ДНК (Раздел 2.3). Из обзора литературы следует, что, несмотря на большое число работ, посвященных разработке и применению методов компьютерного моделирования нуклеиновых кислот, использование новейших иерархических и гибридных подходов все еще ограничено. Это означает, что рассматриваемая проблема остается очень актуальной. Одной из серьезных задач является выбор адекватных математических и физических моделей изучаемых систем (в первую очередь – для учета эффектов среды), применение корректных вычислительных алгоритмов и протоколов и детальная проверка качества получаемых в расчетах результатов. Указанные вопросы автор рассматривает как в общем виде – для всех классов биомолекулярных систем (Раздел 2.1), так и применительно к специфике нуклеиновых кислот (Разделы 2.2, 2.3).

Изложенный в Главе 2 материал непосредственно связан с тематикой работы и четко изложен. Это, несомненно, является хорошим подспорьем для студентов и аспирантов,

начинающих работать в данной области, а также для специалистов, желающих ознакомиться с современным состоянием дел в ней. Отмечу, что для раскрытия темы автор привлекает очень обширный библиографический материал – в Списке литературы 416 ссылок (хотя из них всего 3 работы 2013 г., а работ 2014 г. вообще нет). Изложенный в обзоре литературы материал подводит читателя к логически обоснованным выводам относительно целей диссертационной работы и формулировке конкретных задач, которые необходимо решить.

Представленные в диссертационной работе научные результаты (Глава 3) разбиты на семь разделов – они относятся к изучению в вычислительных экспериментах различных по составу и уровню сложности систем. Следуя сформулированным автором цели и задачам диссертационной работы, в каждом из представленных «модулей» были продемонстрированы индивидуальные подходы к выполнению расчетов и анализу полученных данных. Степень разнообразия и уровень сложности НК-содержащих объектов производят сильное впечатление. Речь идет как о моделировании сложнейших надмолекулярных систем - исследовании конформационных возможностей тмРНК в комплексе с целой рибосомой (Раздел 3.1), анализе взаимодействия макролидных антибиотиков в рибосомном тоннеле (Раздел 3.2) и исследовании динамики аптамера 15-ТВА в комплексе с тромбином (Раздел 3.4), так и о сравнительно более простых объектах – квадруплексах ДНК (Раздел 3.3), аптамере 15-ТВА и его аналогах (Разделы 3.4 – 3.6), а также о шпильке ДНК d(GCGCAGC) (Раздел 3.7). Важно, что при решении каждой из этих задач автор пытается разработать и применить индивидуальный вычислительный протокол, который бы позволил получить максимум полезной информации в рамках выбранной модели и, кроме того, обладал бы минимальным уровнем ошибок расчетов. Так, при рассмотрении наиболее сложной системы - комплекса тмРНК с рибосомой - было использовано сильно упрощенное описание РНК – каждый нуклеотид был аппроксимирован лишь одной частицей, расположенной на атоме фосфора, а связь между частицами, имитирующая сахаро-фосфатный остов, описывалась моделью гармонического осциллятора. Чтобы учесть водородные связи и стэкинг-взаимодействия, были введены ограничения на расстояния. Естественно, точность такого подхода полностью зависит от качества параметризации. Автору удалось решить эту непростую задачу - результаты расчета хорошо согласуются с экспериментальными данными по химической модификации и моделью тмРНК-рибосома, полученной с помощью электронной криомикроскопии. Важно отметить, что в последнем случае экспериментальные данные появились уже после завершения расчетов, что свидетельствует о высокой предсказательной эффективности предложенного в диссертационной работе подхода. Необходимо также сказать, что автор не только использовал готовые программные средства,

но и участвовал в создании нового инструмента моделирования НК – комплекса для расчета пространственной структуры малых РНК на основании данных по их вторичной структуре. Это программное обеспечение реализовано в виде веб-приложения, доступного для всех желающих.

Несмотря на успешное применение «крупнозернистой» модели НК при описании ее комплекса с рибосомой, для решения задачи взаимодействия производных тилозина в рибосомном туннеле было проведено моделирование в полноатомном представлении. Причина – необходимость как можно более строгого учета межмолекулярных взаимодействий. Требуемое для этого упрощение системы было достигнуто за счет выделения подсистемы – ячейки кубической формы, - включающей наиболее важные сайты рибосомного туннеля, молекулу тилозина и молекулы воды. Именно для указанной подсистемы и был произведен расчет МД. Основной аргумент в пользу данного приближения – низкая подвижность сахара-фосфатного остова НК, формирующей туннель. Это дает основание сконцентрировать внимание на поведении лишь отдельных оснований, выстилающих полость туннеля и взаимодействующих с антибиотиком. В итоге был получен целый ряд интересных результатов. В частности, обнаружен новый потенциальный сайт взаимодействия остова «растущего» пептида с группами туннеля. Показано также, что ключевую роль в связывании подобных антибиотиков играют низкоамплитудные движения азотистых оснований рРНК.

Еще одним примером эффективного моделирования сложных систем, включающих НК, являются результаты, полученные для связывания 15-нуклеотидного аптамера 15-ТВА с тромбином. Помимо важной роли, которую играет 15-ТВА в регуляции работы тромбина – фермента, являющегося одним из основных компонентов системы свертывания крови, - гуанин-богатые молекулярные системы представляют большой интерес с точки зрения фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований. В частности, такие участки ДНК встречаются в функционально значимых областях геномов – промоторных и других регуляторных сегментах, теломерах и т.д. Для понимания молекулярных механизмов работы G-квадруплексов и других подобных систем, а также для рационального конструирования на их основе новых биологически активных соединений, действующих на фармакологические мишени в клетке, необходим детальный анализ пространственной структуры и внутримолекулярной динамики указанных объектов в водном растворе, в т.ч. – в присутствии ионов. Методом МД в полноатомном представлении были исследованы различные модификации квадруплексов. Кроме того, на основе анализа уже расшифрованных пространственных структур предложена классификация их топологии (Раздел 3.3.3). Большое внимание в работе было уделено исследованию связывания катионов с аптамером. Расчеты МД в водном окружении позволили автору сделать ряд важных заключений. Во-первых, петли

не играют ключевой роли во взаимодействии катион-аптамер, но они регулируют процесс, защищая, например, структуру 15-ТВА от разрушения; во-вторых, предложены пути проникновения катиона в возможные сайты связывания и выхода из них, сделана оценка относительной стабильности локализации катиона в различных сайтах. Интересным представляется и предлагаемый механизм «захвата» катиона квадруплексом. Полученная методом МД информация о структуре и динамике 15-ТВА, как и о его взаимодействии с катионами, оказалась полезной и для изучения комплексов аптамера с тромбином. Среди наиболее значимых результатов, относящихся к этой части работы, – оценка различных факторов (наличие и конформация петель, картина водородных связей и т.д), влияющих на структуру и динамическое поведение комплексов. В частности, сделан важный вывод о том, что ТТ-петли участвуют в узнавании тромбина, и связывание белка сопровождается релаксацией пространственной структуры G-квадруплекса.

Эти данные позволили автору перейти к практическому использованию результатов диссертационной работы – конструированию на основе аптамера 15-ТВА сенсора тромбина. Интересной представляется идея организации такого сенсора – за основу автор с коллегами-экспериментаторами из МИЭТ взяли углеродные нанотрубки, на поверхности которых адсорбировалась ДНК аптамера. Принцип действия сенсора заключается в том, что при появлении вблизи него тромбина молекулы аптамера из неупорядочной конформации переходят в свернутую форму, способную связываться с белком. Такие структурные преобразования сопровождаются изменением электрической проводимости трубки, что можно детектировать в эксперименте. Как отмечает автор, предварительная проверка показала перспективность нового сенсора, хотя его тестирование продолжается.

Глава 4 («Материалы и методы») посвящена детальному описанию используемых автором вычислительных протоколов, математических моделей и компьютерных программ. В большинстве случаев материал изложен четко и дает подробное представление об использованных подходах. Технические детали Главы 4 описаны достаточно подробно, что позволяет заинтересованным исследователям самостоятельно воспроизвести вычисления, проделанные автором. Это крайне важно для специалистов, занимающихся разработкой новых методических подходов и их программной реализацией.

Считаю, что цель и задачи, сформулированные в работе, достигнуты в ходе её выполнения. Выводы и заключения, представленные автором, логически обоснованы и убедительно показывают новизну и применимость разработанного метода.

По материалам диссертации считаю необходимым сформулировать ряд вопросов и замечаний.

1. На мой взгляд, во Введении к работе не хватает четкой логической схемы проведенных исследований, например, пояснения, каким образом одни модули связаны с другими. Что их объединяет, помимо желания показать, что молекулярное моделирование нуклеиновых кислот можно осуществлять с использованием моделей различного уровня сложности? В частности, Раздел 3.7 «выпадает» из повествования – описанные в нем результаты не обсуждаются во взаимосвязи с результатами, изложенными в других разделах, и не фигурируют в Выводах. Кроме того, нет общего Заключение, в котором можно было бы кратко рассмотреть в совокупности все полученные результаты и обрисовать перспективы дальнейших исследований.
2. Несмотря на довольно обширный обзор литературы (около 70 страниц), практически в каждом разделе Главы 3 («Результаты и обсуждение») присутствует «свой» мини-литобзор, после которого начинается представление результатов. Считаю, что это затрудняет чтение, поскольку объем литературных данных становится излишне большим - приходится все время искать описание результатов, полученных непосредственно соискателем. При этом некоторые разделы Главы 2 можно было бы опустить или сократить, т.к. они касаются описания достаточно известных проблем применения вычислительных моделей различного уровня сложности, рассмотрения их достоинств и недостатков и т.д.
3. На стр. 222 утверждается, что, согласно экспериментальным данным, полученным *in vitro*, сконструированные автором с коллегами тромбиновые аптасенсоры «достаточно чувствительны и специфичны к тромбину». В качестве подтверждения приведен Рис. 3.56, детали которого, однако, не обсуждаются. Более того, подпись к рисунку излишне лаконична – в ней не поясняются многие важные детали. Поскольку сенсорами тромбина занимаются во многих лабораториях, включая Россию, необходимо было сравнить характеристики устройства, предложенного автором, с лучшими мировыми аналогами. К сожалению, в диссертации этой информации нет.
4. В Разделе 3.1.3 произведена оценка достоверности моделирования комплекса тмРНК-4 с рибосомой. При этом автор ссылается на появившиеся данные электронной криомикроскопии и утверждает, что «сравнительный анализ ... выявил достаточно высокую точность моделирования» одних доменов, в отличие от других. Степень соответствия показана в виде картинки, хотя следовало бы такой анализ сделать гораздо более наглядным, приведя, например, численные значения среднеквадратичного отклонения, рассчитанные для разных участков молекулярной системы, показать расположение функционально важных групп в обеих моделях и т.д.

5. При оценке качества моделей, получаемых в ходе расчетов методом молекулярной динамики, не вполне корректно делать выводы о стабильности структуры (тем более – о «ее праве на существование» (стр. 159)), основываясь лишь на значениях среднеквадратичного отклонения от стартовой модели (см. Раздел 3.4.5). На временах около 600 нс такие большие системы, как комплекс тромбин-аптамер, могут просто все еще находиться вблизи исходного состояния.
6. При анализе связывания катионов с аптамером 15-ТВА автор рассматривает лишь данные о заселенности различных состояний – со связанным катионом и без него. Кроме того, описывается кинетика процесса. Как справедливо замечает автор, «очень важно дополнить общую картину данными по изменению свободной энергии» (при связывании/диссоциации), но он тут же констатирует, что «МД не позволяет следить» за этим параметром. Однако метод МД довольно широко применяется – в совокупности с теорией возмущений – для расчетов свободной энергии комплексообразования. Часто, например, применяют метод термодинамического интегрирования и другие подходы. Конечно, это очень затратные вычислительные методы, но они дают вполне корректные результаты даже для таких больших систем как, например, два пептида в явно заданном гидратированном липидном бислое.
7. При обсуждении результатов взаимодействия катионов с аптамером акцент сделан на описании динамического поведения катионов и их пространственной локализации. Вместе с тем, почти ничего не сказано о молекулярных механизмах связывания. Например, возникает вопрос о том, коррелируют ли как-нибудь события проникновения (или выхода) катиона в тот или иной сайт с локальными изменениями геометрии аптамера, структурно-динамическим поведением воды и пр.? Прояснить ситуацию могли бы оценки различных компонентов свободной энергии системы на разных стадиях (см. предыдущее замечание).
8. Длительность траекторий в расчетах МД/КМ составляет лишь 1,6 пс. Это слишком мало, чтобы говорить о каких-нибудь реалистичных механизмах связывания катионов с аптамером, т.к. на таких коротких временных интервалах нельзя учесть конформационную динамику последнего. Кроме того, полученные значения энергии взаимодействия (~ -400 кДж/моль) являются сильно завышенными по модулю. Впрочем, автор и сам это отмечает.
9. На мой взгляд, вывод 1 (стр. 261) сформулирован излишне специализированно, а вывод 5, наоборот, слишком расплывчато – их сложно понять без дополнительного ознакомления с материалами работы.

К недостаткам работы относятся и некоторые погрешности оформления. Так, автор использует ряд неудачных, жаргонных и некорректных выражений, например: «функция кругового распределения» (стр. 7), «транзитное состояние» (стр. 36), «движения в углах» (стр.

36), «анионный заряд» (стр. 45), «деградация структуры» (стр. 47), «патологическое смещение угла» (стр. 56), «потенциал торсионного угла» (стр. 56), «учет электростатики» (стр. 69), «дистанционные ограничения» (стр. 85), «гликозидные углы» (стр. 116), «гибридные КМ/ММ моделирования» (стр. 202), «константа аффинности» (стр. 207) и пр.

Раздел «Список сокращений» больше напоминает глоссарий, т.к. ряд аббревиатур не расшифровывается, а просто дается краткое пояснение к тому, что они означают по смыслу.

В разделе 3.7 автор использует для группы сходных по ряду параметров состояний термин «микросостояние», хотя, согласно традициям статистической физики, более корректно говорить о кластере (группе, семействе) состояний, а под «микросостоянием» понимать лишь точку конфигурационного фазового пространства.

Имеются погрешности в оформлении рисунков. Подписи к некоторым из них (например, 3.13 и аналогичные; 3.56) недостаточно информативны, в них не расшифровываются все детали, необходимые для понимания рисунка. В ссылке на Рис. 3.16 фигурирует значение угла 36° , хотя на самом рисунке такое значение уже находится за пределами оси абсцисс.

Формула на стр. 191 нуждается в пояснении: чему соответствуют используемые обозначения?

В качестве единиц измерения длины автор использует как ангстремы, так и нанометры, причем иногда – в одном предложении. Необходима унификация.

В тексте встречаются многочисленные опечатки и ошибки пунктуации. На стр. 229 фрагмент текста повторяется. В некоторых ссылках вместо номера указаны аббревиатуры – по-видимому, идентификаторы статей из базы данных PubMed (стр. 52, 136, 226).

Вместе с тем, отмеченные недостатки не снижают моей высокой оценки работы Головина А.В. Высказанные замечания носят рекомендательный характер и служат для того, чтобы подчеркнуть сложность поставленной задачи, которая была успешно решена автором. Работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные, хорошо оформлена и легко читается. Полученные автором результаты, наряду с богатым справочным материалом, несомненно, будут полезны не только исследователям, занимающимся структурной биологией нуклеиновых кислот, но и специалистам в других областях – молекулярной биофизике, медицинской химии, биоинформатике. Подобные лаборатории и группы существуют в ВУЗах и научно-исследовательских организациях – на ряде естественнонаучных факультетов МГУ им. М.В. Ломоносова, СПбГУ и др., в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, в Институте химической биологии и

фундаментальной медицины СО РАН, в научных учреждениях РАМН и др.

Выносимые на защиту результаты опубликованы в виде семи статей в реферируемых международных журналах и пяти статей в профильных российских журналах (все издания, за исключением одного, индексируются в библиографической базе данных Web of Science), докладывались на российских и международных научных конференциях. Автор имеет четыре патента по теме диссертационной работы. Автореферат правильно отражает содержание диссертации. Диссертация полностью соответствует пункту 7 требований ВАК, предъявляемых «Положением о порядке присуждения ученых степеней и присвоения ученых званий» к докторским диссертациям, а ее автор, Головин Андрей Викторович, заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Заведующий лабораторией моделирования биомолекулярных систем
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

доктор физико-математических наук,
профессор

28 мая 2014 г.



Р.Г. Ефремов

Подпись проф. Р.Г. Ефремова удостоверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН
д.ф.-м.н.



В.А. Олейников