

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора химических наук, главного научного сотрудника лаборатории рефлектометрии и малоуглового рассеяния Института кристаллографии им. А.Н. Шубникова РАН ФИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН Волкова Владимира Владимировича на диссертационную работу **Морячкова Романа Владимировича "Пространственная структура ДНК-аптамеров по данным малоуглового рентгеновского рассеяния"**, представленную на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.8. Физика конденсированного состояния.

Диссертационная работа Р. В. Морячкова посвящена исследованию молекул ДНК-аптамеров методом малоуглового рентгеновского рассеяния. ДНК-аптамеры представляют собой короткие олигонуклеотиды – аморфные органические молекулы, образующие неупорядоченную дисперсную систему в растворе. Вследствие хаотической ориентации структурных элементов исследование их структурной организации представляет собой сложную методологическую задачу. Сложность усугубляется тем, что часто изучаемые объекты, особенно органической природы, невозможно закристаллизовать. Поэтому вполне оправданным является применение в данной работе метода малоуглового рассеяния, предоставляющего информацию о морфологии наночастиц и неоднородностей в некристаллических системах. Будучи неразрушающим, этот метод позволяет исследовать коллоидные растворы как неорганической, так и органической природы в естественном состоянии.

Актуальность работы не вызывает сомнений, так как ДНК-аптамеры предложены как молекулярные структуры, на базе которых разрабатываются перспективные комплексы и другие соединения с управляемыми свойствами для применения в различных направлениях терапии и диагностики различных заболеваний, в том числе онкологических. Результаты работы будут востребованы исследователями, занимающимися синтезом медицинских препаратов нового поколения.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов. В процессе выполнения работы впервые получены структурные параметры и морфология частиц ДНК-аптамеров в растворе. Эти результаты были использованы для уточнения структуры биомолекул и построения их молекулярных моделей. Сложность изучения ДНК-аптамеров вызвана тем, что данные молекулы в большинстве своём не поддаются кристаллизации, чтобы применить к ним методы рентгеновской дифракции. Кроме этого, их функциональные свойства, которые зависят от структуры, могут отличаться в растворе от свойств в кристаллической форме, поэтому их необходимо исследовать в естественном состоянии, в растворе. Метод ЯМР может предоставлять необходимую структурную информацию о биомакромолекулах в растворе, но ограничен невысокой молекулярной массой частиц. Криоэлектронная микроскопия наоборот, может давать полезную информацию только в случае больших размеров биообъектов из-за малого контраста электронной плотности. В связи с этим, выбор метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) является обоснованным и наиболее применимым для определения структурных особенностей биомолекул в растворе. Результаты диссертационной работы хоть и относятся скорее к области исследования конденсированного состояния органических молекул в жидкой среде, полученные данные будут востребованы в биологических и медицинских целях для разработки средств диагностики, терапии и визуализации, а также биологических сенсоров на основе ДНК-аптамеров. Подробное изложение экспериментальных методик в работе и применения методов анализа данных имеет, ко всему прочему, и **методологическую ценность**.

Достоверность результатов выполненной работы и выводов, сформулированных диссертантом, подтверждается детальным перекрестным сравнением результатов анализа данных МУРР с результатами метода молекулярной динамики и данными кристаллографии, где это возможно. Анализ данных МУРР был проведен с использованием известных и хорошо зарекомендовавших себя в мировом научном сообществе программ. Надежность используемых программ обеспечена большим количеством публикаций, в которых

проводили сравнение результатов изучения биологических объектов с широким спектром других физико-химических методов. По теме диссертации опубликованы 8 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в списки ВАК, Web of Science и Scopus. Результаты работы были представлены на большом числе всероссийских и международных конференций.

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка цитируемой литературы из 87 источников. Объем диссертации составляет 94 страницы, текст включает 52 рисунка и 3 таблицы. Текст диссертации хорошо структурирован, работа написана ясным языком и легко читается. Все необходимые для понимания сведения представлены в тексте. Каждая глава оканчивается краткими выводами.

В первой главе приводится описание экспериментальной техники, теории и методов анализа данных основного метода исследования – малоуглового рентгеновского рассеяния.

Во второй главе представлены результаты измерений МУРР и полученные пространственные структуры ДНК-аптамеров Gli-233, Gli-55, AS-14t, RE31, HD22. Рассмотрены случаи полидисперсных растворов с присутствием олигомеров. Проведено сравнение структуры ДНК-аптамеров в растворе с кристаллографическими структурами этих биомолекул, для аптамеров HD22 и NU172 показаны отличия в интенсивности рассеяния, а следовательно и в конформациях данных биомолекул в растворе и в кристалле.

В третьей главе приведены результаты исследования конформационных изменений ДНК-аптамеров при варьировании температуры образцов, приведено сравнение с данными ядерного магнитного резонанса и спектроскопии кругового дихроизма. Приведены результаты исследования стабильности аптамеров при изменении относительной концентрации двухвалентных ионов кальция и магния, а также тяжелых металлов (свинца и ртути) в буферном растворе. Показано, что в случае легких ионов конформация аптамеров довольно стабильна, тогда как тяжелые ионы вызывают агрегацию макромолекул. Показана зависимость конформации макромолекул и химической активности при изменении

температуры раствора, определена температура начала разворачивания элементов их вторичной структуры.

В четвёртой главе показаны подходы по применению данных МУРР для проверки теоретически рассчитанных молекулярных моделей ДНК-аптамеров. Для исследования аптамера LC-18t был применен режим измерений МУРР с использованием хроматографической колонки (SEC-SAXS), который позволил построить 4 различных вторичных структуры, которые были использованы для проведения молекулярного моделирования. Полученные молекулярные модели были проверены на соответствие экспериментальным данным МУРР с помощью трёх программ, использующих разные математические подходы.

Пятая глава посвящена изучению надмолекулярных структур, таких как олигомеры ДНК-аптамеров и комплексы аптамер-белок. Получены структурные параметры отдельно для аптамера и белка, показано отсутствие тенденции к олигомеризации этих биомолекул. Показано увеличение и изменение формы структуры комплекса аптамера Apt31 с белком RBD коронавируса SARS-CoV-2. Для аптамера к интерлейкину предсказано наличие квадруплекса именно в тетрамерной форме молекулярной структуры аптамера.

В заключении диссертации сформулированы основные результаты и выводы проделанной работы.

Следует сделать некоторые **замечания** по диссертационной работе:

1. На рисунке 2.17 приведены значения невязки для модели из рентгеноструктурного анализа и для молекулярной модели в сравнении с данными МУРР. Значения слишком высокие, чтобы считать такие модели совпадающими, вопрос либо к методу расчёта этих значений, либо к диапазону вектора рассеяния s , в пределах которого графики МУРР сравнивались.
2. Для аптамера LC-18t приведена таблица значений невязки между экспериментальными данными МУРР и теоретическими графиками МУРР от молекулярных моделей аптамера. Для структуры Model4/FMO невязка ещё

меньше, чем для выбранной лидирующей структуры Model3/MD(3), 2.11 против 2.89 (по данным программы CRY SOL). Почему выбрана именно структура Model3/MD(3)?

3. Почему для белка коронавируса SARS-CoV-2 и аптамера Apt31 к нему не построены как минимум шариковые модели МУРР, а приведены только сравнения графиков интенсивностей и функций парных расстояний?
4. Графики МУРР не унифицированы, на одних единицы измерений указаны 1/нм, на других нм⁻¹, на третьих - 1/Å.
5. На некоторых рисунках подписи очень мелкие, вплоть до нечитаемости.
6. В тексте диссертации нет списка статей автора (он выложен в виде отдельного файла), тогда как список выступлений на конференциях приведен.

Отмеченные замечания не снижают общую положительную оценку выполненной работы и не влияют на основные результаты диссертации.

Аннотация соответствует основному содержанию диссертации.

Диссертационная работа Р.В. Морячкова является законченным трудом, выполненным соискателем самостоятельно на хорошем научно-методическом уровне. Результаты, приведённые в работе, обоснованы и содержат в себе решение актуальной научной и практически значимой проблемы. Основные положения и результаты **своевременно и полно опубликованы** в 8 научных статьях в рецензируемых журналах, 3 из которых входят в Перечень журналов ВАК, 5 статей опубликованы в журналах, входящих в индексы цитирования Scopus и Web of Science. Положения диссертации, выносимые на защиту, полностью доказаны результатами работы.

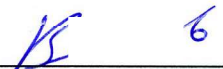
По объёму и оригинальности представленного материала, а также по научной значимости полученных результатов диссертационная работа "Пространственная структура ДНК-аптамеров по данным малоуглового рентгеновского рассеяния" удовлетворяет всем критериям Положения о присуждении ученых степеней (утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации

от 24.09.2013 г. № 842 в действующей редакции), предъявляемым к диссертационным работам, а её автор, Морячков Роман Владимирович, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.8. "Физика конденсированного состояния".

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник лаборатории рефлектометрии
и малоуглового рассеяния Института кристаллографии им. А.В.Шубникова
ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН,
доктор химических наук по специальности 01.04.18 "Кристаллография, физика
кристаллов"

Волков Владимир Владимирович


" 21 " ноября 2022 г.

Федеральное государственное учреждение "Федеральный научно-исследовательский центр "Кристаллография и фотоника" Российской академии наук", Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова, лаборатория рефлектометрии и малоуглового рассеяния.

119333, г. Москва, Ленинский пр-т, д.59.

Тел. +7(499)135-54-50, +7(926)963-38-06

E-mail: vvo@ns.crys.ras.ru, volkicras@mail.ru

Подпись В. В. Волкова заверяю

Ученый секретарь ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

к.ф.-м.н.



 / Архарова Н. А. /

Сведения об официальном оппоненте

Волков Владимир Владимирович, доктор химических наук по специальности 01.04.18 "Кристаллография, физика кристаллов", главный научный сотрудник Института кристаллографии им. А.В. Шубникова Российской академии наук Федерального государственного учреждения "Федеральный научно-исследовательский центр "Кристаллография и фотоника" Российской академии наук" (ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН), почтовый адрес 119333, г. Москва, Ленинский проспект, д. 59, телефоны +7(499)135-54-50, +7(926)963-38-06, E-mail: vvo@ns.crys.ras.ru, volkicras@mail.ru.

Список работ по теме диссертации за последние 5 лет

1. Крюкова, А. Е. Исследование устойчивости решений при анализе полидисперсных систем методом малоуглового рассеяния / А. Е. Крюкова, П. В. Конарев, В. В. Волков. // Кристаллография. – 2018. – Т. 63. – № 1. – С. 32–37. – DOI: 10.7868/S0023476118010113
2. Крюкова, А. Е. Оценка устойчивости решений при восстановлении функции распределения частиц в растворе кремнезоля по размерам по данным малоуглового рассеяния / А. Е. Крюкова, А. С. Козлова, П. В. Конарев, В. В. Волков, В. Е. Асадчиков // Кристаллография. – 2018. – Т. 63. – №4. – С. 524–529. – DOI: 10.1134/S002347611804015X
3. Крюкова, А. Е. Восстановление формы бычьего фибриногена в растворе по данным малоуглового рассеяния / А. Е. Крюкова, А. И. Шпичка, П. В. Конарев, В. В. Волков, П. С. Тимашев, В. Е. Асадчиков // Кристаллография. – 2018. – Т. 63. – № 6. – С. 862–865. – DOI: 10.1134/S0023476118060206
4. Sokolov, A. V. Structural Study of the Complex Formed by Ceruloplasmin and Macrophage Migration Inhibitory Factor / A. V. Sokolov, L. A. Dadinova, M. V. Petoukhov, G. Bourenkov, K. M. Dubova, S. V. Amarantov, V. V. Volkov,

- V. A. Kostevich, N. P. Gorbunov, N. A. Grudinina, V. B. Vasilyev, V. R. Samygina // *Biochemistry (Moscow)*. – 2018. – V. 83. – № 6. – P. 701–707. – DOI: 10.1134/S000629791806007X
5. Kryukova, A.E. Restoring silicasol structural parameters using gradient and simulation annealing optimization schemes from small-angle X-ray scattering data / A.E. Kryukova, P.V. Konarev, V.V. Volkov, V.E. Asadchikov // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – V. 283. – P. 221–224. – DOI: 10.1016/j.molliq.2019.03.070
 6. Shpichka A. I. Digging Deeper: Structural Background of PEGylated Fibrin Gels in Cell Migration and Lumenogenesis / A. I. Shpichka, P. V. Konarev, Yu. M. Efremov, A. E. Kryukova, N. A. Aksenova, S. L. Kotova, A. A. Frolova, N. V. Kosheleva, O. M. Zhigalina, V. I. Yusupov, D. N. Khmelenin, A. Koroleva, V. V. Volkov, V. E. Asadchikov, P.S. Timashev // *RSC Advances*. – 2020. – V. 10. – P. 4190–4200. – DOI: 10.1039/c9ra08169k
 7. Konarev, P.V. The Structural Features of Native Fibrin and Its Conjugates with Polyethylene Glycol and Vascular Endothelial Growth Factor according to Small-Angle X-Ray Scattering / P. V. Konarev, V. A. Grigorev, P. Yu. Bikmulin, V. S. Presnyakov, A. E. Kryukova, V. V. Volkov, A. I. Shpichka, V. E. Asadchikov, and P. S. Timashev // *Review Journal of Chemistry*. – 2020. – V. 10. – No. 3–4. – P. 158–163. – DOI: 10.1134/S2079978020030036
 8. Chukhontseva, K. N. The protealysin operon encodes emfourin, a prototype of a novel family of protein metalloprotease inhibitors / K. N. Chukhontseva, I. M. Berdyshev, D. R. Safina, M. A. Karaseva, T. N. Bozin, V. V. Salnikov, P. V. Konarev, V. V. Volkov, A. V. Grishin, V. I. Kozlovskiy, S. V. Kostrov, I. V. Demidyuk // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 169. – P. 583–596. – DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.170
 9. Волков, В. В. О тактике *ab initio*–поиска формы белковых частиц по данным малоуглового рентгеновского рассеяния / В. В. Волков // *Кристаллография*. – 2021. – Т. 66. – Вып. 5. – С. 793–801. – DOI:10.31857/S0023476121050234

10. Петухов, М. В. Проблема неоднозначности решения обратных задач малоуглового рассеяния: последовательный подход на примере рецептора, подобного рецептору инсулина. Методы интерпретации данных МУРР / М. В. Петухов, П. В. Конарев, В. В. Волков, А. А. Можаяев, Э. В. Штыкова // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2021. – Т. 38. – № 4. – С. 268–283. – DOI: 10.31857/S0233475521040095
11. Konarev, P. V. EFAMIX, a tool to decompose inline chromatography SAXS data from partially overlapping components / P. V. Konarev, M. A. Graewert, Cy M. Jeffries, M. Fukuda, T. A. Cheremnykh, V. V. Volkov, D. I. Svergun // Protein Science. – 2022. – V. 31. – P. 269–282. – DOI:10.1002/pro.4237

Главный научный сотрудник лаборатории рефлектометрии и малоуглового рассеяния Института кристаллографии им. А. В. Шубникова ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН,
доктор химических наук по специальности 01.04.18 "Кристаллография, физика кристаллов",

Волков Владимир Владимирович

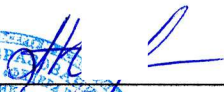

" 21 " ноября 2022 г.

Подпись В. В. Волкова заверяю

Ученый секретарь ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

к.ф.-м.н.



 / Архарова Н. А. /