

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Мелехова Владислава Викторовича «**Исследование механизмов взаимодействия мультифункционального белка DPS *Escherichia coli* с ДНК**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Актуальность исследования. Диссертационная работа Мелехова Владислава Викторовича посвящена исследованию механизмов взаимодействия мультифункционального белка Dps *Escherichia coli* с ДНК. Известно, что все живые организмы используют специальные структурные белки для сохранения своего генома в функционально активном состоянии. У прокариот эту функцию выполняют ряд белков, которые способны формировать нуклеопротеидные комплексы с ДНК за счёт распознавания структурных особенностей двойной спирали или специфических нуклеотидных последовательностей бактериальной хромосомы. К таким белкам относится Dps – полифункциональный белок, играющий ключевую роль в упаковке бактериального генома. К настоящему времени результаты научных исследований, направленных на выяснение механизмов связывания белка Dps с ДНК, не позволяют сделать однозначных выводов о способе этого взаимодействия. В частности, на основании одних данных высказывается предположение, что белок Dps формирует неспецифические комплексы с отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом. Другие данные дают основание утверждать, что этот белок связывается с конкретными нуклеотидными последовательностями, что указывает на специфичность этого связывания. Принимая во внимание вышеуказанные научные противоречия, можно с уверенностью утверждать, что актуальность и научная важность данной диссертационной работы, цель которой заключалась в исследовании механизмов формирования нуклеопротеидных комплексов белка Dps с ДНК, а также в изучении возможности построения упорядоченных макромолекулярных структур на основе данного механизма, не вызывают сомнений.

Диссертационная работа написана по традиционному плану. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста: состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов с обсуждениями, заключения, выводов, а также списка литературы. Диссертация включает 3 таблицы и 44 рисунка. Список литературы содержит 220 источников.

Обзор литературы написан компактно, без перегрузки деталями и хорошо проиллюстрирован. В данной главе представлены разделы с описанием структуры и функциональных свойств белка Dps. В разделе 1.5 подробно описаны предполагаемые механизмы взаимодействия белка Dps с ДНК. Значительная часть главы «Обзор литературы» посвящена прикладным аспектам исследования нуклеопротеидных комплексов.

Глава 2 посвящена описанию методической части работы. В работе используется широкий набор методов молекулярной биологии, биофизических и биохимических методов исследования, в частности, таких как: получение рекомбинантного белка, секвенирование фрагментов ДНК, ПЦР, ДСН-гель-электрофорез, хроматографические методы очистки белка, XANES-спектроскопия (X-ray Absorbption Near Edge Structure), футпринтинг ДНК – метод поиска в структуре ДНК нуклеотидных последовательностей для ДНК-связывающих белков. С помощью метода EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) в работе проводили оценку эффективности взаимодействия белка Dps с отдельными линейными фрагментами ДНК и их смесью. Метод атомно-силовой микроскопии был использован для анализа морфологии отдельных молекул Dps, фрагментов ДНК и их нуклеопротеидных комплексов. Методом динамического рассеяния света проводилась оценка гидродинамического радиуса частиц Dps и его комплексов. Исследование кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов Dps с линейными и искусственными разветвленными фрагментами проводилось посредством метода поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора ProteOn XPR (BioRad, США). Для выяснения способности фрагментов ДНК формировать изгибы двойной спирали использовалась компьютерная программа DNA Tools, визуализация проводилась с помощью программы RasMol.

Следует отметить, что методы, используемые в работе, достаточно подробно описаны, что важно, поскольку позволит заинтересованным исследователям воспроизвести все необходимые экспериментальные условия.

Научная новизна исследования и практическая ценность работы. Глава 3 посвящена полученным результатам и их обсуждению. Перед началом экспериментов диссертантом было проведено моделирование пространственной структуры фрагментов ДНК, содержащих регуляторную область гена *dps* с использованием программы DNA Tool. Выбранные области ДНК потенциально

обладали высоким сродством к белку Dps. Поэтому, на следующем этапе работы были получены в ПЦР выбранные фрагменты ДНК и проведены исследования их морфологических особенностей методом атомно-силовой микроскопии.

Следующий этап экспериментальной работы заключался в анализе вариаций олигомерных форм белка Dps методом динамического светорассеяния, а также в исследовании морфологии этого белка методом атомно-силовой микроскопии. Результаты проведенных исследований показали, что белок Dps имеет размеры 7-10 нм. При исследовании других физико-химических свойств Dps, методом спектрофлуориметрии показано, что этот белок имеет характерный спектр флуоресценции с максимумом в области 332 нм. Полученные данные позволили автору сделать предположение, что основной вклад в формирование спектра флуоресценции Dps вносит триптофан. С использованием XANES-спектроскопии в работе доказано присутствие в составе неорганического ядра Dps *E. coli* ионов железа с различным зарядовым состоянием (Fe^{3+} и Fe^{2+}) в тетра- и октаэдрическом окружении атомами кислорода.

Раздел 3.4. главы 3 «Полученные результаты и их обсуждение» посвящен исследованию способности белка Dps формировать нуклеопротеидные комплексы с выбранными фрагментами ДНК. Для этого в работе был использован метод задержки ДНК-белковых комплексов в геле. Было установлено, что все используемые фрагменты (4 фрагмента ДНК, полученных в ПЦР: *L*, *hns-1*, *hns-2* и *yea1*) обладают способностью взаимодействовать с Dps. При этом также было установлено, что в условиях конкуренции фрагмент *S* (содержащий функциональный промотор *P1*), имеет бóльшее сродство к Dps, чем дистальная часть регуляторной области (фрагмент *H*). Полученные результаты можно отнести в поддержку предположения о наличии в бактериальной хромосоме участков ДНК, которые обладают повышенным сродством к белку Dps. Данное предположение было подтверждено в работе и результатами исследований с использованием футпринтинга ДНКазой I нуклеопротеидных комплексов, а также данными атомно-силовой микроскопии, свидетельствующими о взаимодействии белка Dps с ДНК.

Задача следующего этапа работы заключалась в проектировании и сборке разветвлённых самособирающихся Y-подобных молекул ДНК различной структуры, используя технологию ДНК-оригами, с целью изучения связывания с ними белка Dps. По данным атомно-силовой микроскопии было выявлено, что

Dps преимущественно взаимодействует с точками ветвления Y-ДНК, но также наблюдалось его связывание с концевыми участками линейных ДНК. С помощью электрофоретического фракционирования смеси, полученной при самосборке искусственных разветвлённых ДНК, было выявлено, что Dps более эффективно взаимодействует с их триplexами, а не дуплексами. Анализ морфологии поверхности таких нуклеопротеидов с помощью атомно-силовой микроскопии выявил, что Dps преимущественно локализован на внутренней части Y-подобных ДНК.

В заключительной части главы 3 (в разделе 3.8) описаны результаты исследований возможных конформационных изменений додекамеров Dps при формировании нуклеопротеидных комплексов, изменений их стабильности, а также констант ассоциации и диссоциации при взаимодействии с различными фрагментами ДНК. Эти исследования проводились с использованием ряда методов. В частности, оценку конформационных изменений молекул Dps отдельно и в составе нуклеопротеида при действии различной температуры проводили с использованием метода динамического светорассеяния и флуоресцентной спектроскопии. Константы ассоциации-диссоциации комплексов Dps-ДНК измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса. Анализ полученных результатов позволил диссертанту сделать обоснованный вывод о том, что стабильность нуклеопротеидного комплекса, образованного Dps с разветвлённым фрагментом ДНК (в частности, с Y5-Y6-Y7), обладает большей стабильностью по сравнению с нуклеопротеидным комплексом, в состав которого входит линейный фрагмент ДНК (в частности, H).

На основании полученных в работе результатов предложена модель взаимодействия белка Dps с разветвлёнными участками бактериального генома, учитывающая возможность формирования максимального числа контактов олигомера Dps с ДНК.

Значимость для науки и практики. Результаты диссертационной работы расширяют фундаментальные представления о механизмах формирования нуклеопротеидных комплексов. Результаты исследования имеют важное прикладное значение, поскольку фундаментальные знания о специфичности связывания белка Dps с определёнными участками ДНК позволят создавать структуры на основе нуклеопротеидных комплексов с заданным расположением

молекул, которые, в свою очередь, можно использовать при создании квантовых точек транзисторов, для создания нанобатарей, в качестве реакторов для получения гомогенных частиц, а также в медицинских целях, например, для доставки лекарств.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Результаты диссертации следует использовать при разработке учебных курсов по молекулярной биологии, биофизики и биохимии в университетах Российской Федерации. Спроектированные и полученные в работе конструкции нанометрового диапазона в будущем могут быть использованы для решения прикладных задач в различных областях научно-промышленного комплекса России, в частности, в электронно-технической промышленности и медицине.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертантом получены оригинальные новые результаты, важные как для фундаментальной, так и прикладной науки. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Выводы диссертации логично вытекают из представленного материала и подкреплены надёжными экспериментальными данными. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из которых 3 – в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ и индексируемые в реферативных базах данных Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора диссертации состоял в проведении всех экспериментов и исследований в рамках диссертационной работы, в частности, автор проводил выделение и очистку белка Dps (методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации), получал фрагменты ДНК (методами ПЦР и электрофоретического фракционирования), исследовал взаимодействие белка Dps с ДНК методом EMSA, исследовал термодинамические и кинетические характеристики взаимодействия (методами динамического светорассеяния и поверхностного плазмонного резонанса), проводил изучение морфологических характеристик отдельных молекул ДНК, белка Dps и их комплексов методом атомно-силовой микроскопии, подготавливал пробы для XANES-спектроскопии, участвовал в обработке, анализе и интерпретации полученных результатов, в написании научных статей и других публикаций.

К диссертационной работе имеется ряд замечаний и вопросов.

- К главе 1 «Обзор литературы» имеется следующее техническое замечание: в тексте раздела 1.6.4 пропущено указание на рисунок 15.

- Имеется замечание к разделу 2.13. главы 2 «Материалы и методы исследования»: измерения собственной флуоресценции свободных молекул нативного Dps и его нуклеопротеидных комплексов, по-видимому, проводились не на спектрофотометре (как написано в работе), а на спектрофлуориметре Perkin Elmer 44B (PerkinElmer, Inc).

- В разделе 2.11 в таблице 2 среди олигонуклеотидов, используемых для формирования самособирающихся Y-подобных ДНК структур, не представлен олигонуклеотид Y4. Почему?

Имеются замечание к главе 3 «Полученные результаты и их обсуждение».

- В разделе 3.1. указано, что значение ширины фрагментов ДНК, исследуемых методом атомно-силовой микроскопии, несколько выше расчётной и соответствует порядка 20 нм. Однако в тексте и диссертации, и автореферата не указана расчётная (предполагаемая) ширина исследуемых фрагментов ДНК.

- Замечание имеется к представленной последовательности изложения результатов исследования в главе 3. Раздел 3.1, с которого начинается глава 3, и который посвящен описанию результатов моделирования пространственной структуры фрагментов ДНК, а также результатов исследования их морфологических особенностей, на мой взгляд, должен быть расположен перед разделом 3.4, в котором описываются результаты экспериментов по связыванию белка Dps с ДНК. Представленное в работе изложение полученных результатов немного усложняет их восприятие.

- Имеется техническое замечание к разделу 3.4. В подписи к рисунку 32 указано, что гель окрашивали бромистым этидием и нитратом серебра. При этом на рисунке представлена картинка гелей, окрашенных нитратом серебра, тогда как картинки, окрашенной бромистым этидием, не представлено, что усложняет восприятие результатов исследования.

Имеется техническое замечание, относящееся к рисункам, представленным в диссертации: в рисунках, состоящих из нескольких частей, для обозначения этих частей используются буквы английского, а не русского алфавита.

Высказанные в отзыве замечания не являются принципиальными и не снижают высокой оценки представленной работы.

Заключение. Диссертационная работа Мелехова Владислава Викторовича «Исследование механизмов взаимодействия мультифункционального белка DPS *Escherichia coli* с ДНК» является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и имеющей большое научное и практическое значение. По актуальности изучаемой проблемы, научной новизне, практической значимости и обоснованности выводов представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, (с изменениями № 335 от 21.04.2016), предъявляемым ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Мелехов Владислав Викторович заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Главный научный сотрудник со степенью доктора наук
с возложением обязанностей заведующего лабораторией
Структуры и функций мышечных белков
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук, доктор биологических
наук (специальность «Биофизика») Иван Милентьевич Вихлянцев

04.04.2018

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3
Тел. 8(4967) 739-334, +7 925 2874090.
E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

«Подпись И.М. Вихлянцева» удостоверяю

Ученый секретарь ФГБУН ИТЭБ РАН

к.б.н.



И.Ю. Попова

04.04.2018