



«УТВЕРЖДАЮ» \_\_\_\_\_

Проректор по научной работе

ИИГУ им. Н.И. Лобачевского

д.ф.-м.н. В.Б. Казанцев

«10» сентября 2018

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Мелехова Владислава Викторовича на тему: «Исследование механизмов взаимодействия мультифункционального белка Dps *Escherichia coli* с ДНК», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности – 03.01.02 Биофизика

#### Актуальность темы.

Диссертация Мелехова В.В. посвящена изучению взаимодействия мультифункционального белка Dps *Escherichia coli* с ДНК и анализу физико-химических свойств как отдельно его молекул, так и в составе нуклеопротеидных комплексов. Белок Dps участвует в ряде важных клеточных процессов. В частности, он является основным архитектурным фактором бактериальной хромосомы на стационарной фазе роста, способен утилизировать ионы двухвалентного железа с использованием перекиси водорода, тем самым снижая эффективность реакции Фентона. То есть на белок возложена антиоксидантная функция, так как DPS фактически участвует в реакции  $2 \text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{Fe}^{3+} + 2 \text{H}_2\text{O}$ . В отсутствие DPS протекает реакция Фентона  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + ^-\text{OH}$ , в которой образуется опасный и реакционно-способный гидроксильный радикал. Считается, что Dps не способен распознавать конкретные нуклеотидные последовательности в структуре ДНК, а взаимодействие его олигомеров с отрицательно заряженной ДНК осуществляется за счет N-концевых участков мономеров, несущих положительный заряд. Данные знания не приближают к пониманию механизма лежащего в основе процессов упорядоченной конденсации генетического материала во время стационарного роста *E. coli* и ремодуляции при возвращении бактериальных клеток в фазу активного деления. Понимание физико-химических механизмов лежащих в основе формирования нуклеопротеидных комплексов с участием Dps и факторов влияющих на этот процесс является актуальной фундаментальной задачей. Помимо этого, особенности структурно-функциональной

организации Dps позволяют его рассматривать как перспективный объект прикладных исследований в области создания молекулярных конструкций с заданными свойствами наноразмерного диапазона. Таким образом, исследование механизмов взаимодействия белка Dps с различными участками ДНК имеет важное фундаментальное и прикладное значение.

#### **Новизна исследования, полученных результатов и выводов.**

Научная значимость и новизна работы заключается в том, что автором впервые был выявлен и уточнен ряд фактов и закономерностей. Так, с использованием рентгено-спектральных методов исследования установлено присутствие в составе неорганического ядра Dps ионов железа разной степени окисления. Показано, что белок Dps обладает повышенным сродством к участкам ДНК, обогащенным АТ-парами. Выявлены два новых способа локализации Dps на фрагментах линейных и разветвленных фрагментов ДНК. Полученные результаты позволили автору продемонстрировать возможность создания самособирающихся Y-подобных структур ДНК, обеспечивающих управляемую иммобилизацию Dps на их поверхности. При этом автором проведена оценка кинетических и термодинамических характеристики комплексов сформированных Dps с фрагментами ДНК различной организации и выявлены их отличия.

Полученные результаты получили свое отражение в заключительной гипотетической схеме взаимодействия Dps с ДНК учитывающей возможность формирования максимального числа контактов олигомеров Dps с ДНК и соседними олигомерами. Таким образом, результаты полученные Мелеховым В.В. имеют научную значимость как с точки зрения расширения фундаментальных представлений об особенностях молекулярных механизмов упаковки бактериального нуклеоида, так и точки зрения прикладного использования белка Dps и его комплексов для создания молекулярных конструкций с заданными характеристиками и свойствами.

#### **Анализ содержания диссертации.**

Диссертационная работа В.В. Мелехова, изложенная на 136 страницах машинописного текста, имеет стандартную структуру, включающую следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, полученные результаты и их обсуждение (3 таблицы и 44 рисунка), выводы, а также список литературы (220 источников).

Во введении автор обосновывает актуальность темы работы, обозначает нерешенные фундаментальные задачи в области исследования физико-химических характеристик белка Dps, а также возможные направления практического использования этого белка. В целом, информация, изложенная во введении, позволяет В.В. Мелехову аргументировать целесообразность диссертационного исследования.

Глава I «Обзор литературы» содержит 7 разделов. В обзоре литературы приведены общие характеристики функциональных свойств белка Dps, обозначена его связь с суперсемейством белков-ферритинов. Разобраны данные о структуре мономеров и олигомеров белка Dps, способность мономеров Dps к олигомеризации. Отдельный пункт посвящен особенностям строения ферроксидазного центра Dps. Приведены возможные модели взаимодействия Dps с ДНК. Также в главу Обзор литературы помещены два пункта сфокусированные на прикладных аспектах исследования нуклеопротеидных комплексов. В целом, обзор литературы, суммирует имеющиеся на сегодняшний день данные о белке Dps. Изложенные данные последовательны и логичны, что позволяет полноценно осознать значимость представленной работы.

Глава II «Материалы и методы исследования» представляет собой перечень использованных методов. Стоит отметить, что в отличие от автореферата, описание материалов и методов исследования в диссертации выполнено очень подробно. В работе В.В. Мелехова использованы как классические биофизические, биохимические и молекулярно-биологические методы (различные виды хроматографического и электрофоретического фракционирования, радиоавтография, центрифугирование, динамическое светорассеяния, флуоресцентная спектроскопия, атомно-силовая микроскопия, ПЦР, поверхностный плазмонный резонанс и др.), так и современные методы, в частности XANES-спектроскопия. При описании XANES-спектроскопии автор привел даже теоретическую часть, что, безусловно, является еще одним плюсом диссертации. Использование широкого методологического спектра позволило автору провести разносторонние исследования и получить ценные результаты.

Глава III «Полученные результаты и их обсуждение» содержит восемь пунктов, связанных логикой проведения исследования. В первом пункте проведен выбор фрагментов ДНК для оценки сродства Dps к ним. В результате проведенных экспериментов, выявлено, что молекулы белка Dps обладают большим сродством к АТ-богатым участкам ДНК, которые потенциально обладают меньшей термодинамической стабильностью двойной спирали и склонны к адаптивной изомеризации. Проведено исследование физико-химических характеристик как растворов, содержащих олигомеры Dps, так и отдельных его молекул. Это позволило автору сформировать полноценное представление о свойствах объекта исследований. На следующем этапе автор подробно изучил характеристики неорганического ядра, содержащегося в додекамерах Dps, в результате которых было выявлен его неоднородный состав. Полученные данные позволили автору приступить к тестированию сродства Dps к регуляторной области собственного гена и ее составным частям. Показано, что наибольшим сродством обладает фрагмент регуляторной области,

содержащий основной промотор гена *dps*, который обеспечивает максимальную экспрессию данного гена в нормальных условиях роста клеток. Использование радиоавтографического метода позволило выявить сайты защиты фрагментов регуляторной области ДНК с помощью Dps от воздействия ДНКазы I. Исследование морфологии комплексов образованных Dps с фрагментами ДНК регуляторной области гена *dps* позволило выявить два новых способа его локализации на молекулах ДНК, которые свидетельствуют о том, что белок располагается на одном из концевых участков ДНК. Поэтому на следующем этапе автором были спроектированы и получены несколько модельных разветвленных структур ДНК. Анализ их морфологических характеристик выявил, что в случае разветвленных, самособирающихся Y-подобных молекул ДНК, Dps преимущественно взаимодействует с их точкой ветвления, а не с концевыми участками. Поэтому следующий раздел автор посвятил изучению термодинамических характеристик комплексов образованных Dps с линейными и разветвленными участками ДНК. Полученные данные свидетельствуют о том, что в составе нуклеопротеидного комплекса белок обладает большей термостабильностью. Интересно, что экспериментально полученное значение константы связывания Dps с линейными и разветвленным ДНК отличается на порядок, что свидетельствует о более высокой стабильности комплексов, образованных с Y-подобными ДНК. В последнем пункте автором проведено моделирование распределения электростатического потенциала на поверхности белка Dps. Обоснована гипотетическая схема взаимодействия додекамеров белка, как с линейными, так и с разветвленными участками ДНК. В заключении автор обобщает полученные результаты, предпринимает попытки их интерпретировать.

Обсуждение результатов полученных В.В. Мелеховым подчеркивает особую роль белка Dps в ряде клеточных процессов. Выдвинут ряд предположений: о возможности неравномерного распределения Dps по бактериальной хромосоме, о возможности его участия контроле участков ДНК содержащих кластеры CRISPR или тандемные сайты связывания факторов транскрипции. Помимо этого, неоднородный состав неорганического ядра Dps и близость поры белковой глобулы, ведущей во внутреннюю полость белка, которая в составе комплекса с разветвленной ДНК располагается в непосредственной близости от генетического материала, дает автору основание предположить, что Dps потенциально может участвовать в структурно-специфическом разрушении аминокислот.

Рецензируемая работа характеризуется четкой постановкой задач и высоким методическим уровнем их решения. Автор лично участвовал в проведении экспериментов, обработке полученных данных и подготовке научных трудов. По результатам диссертационной работы опубликовано 9 печатных работ в российских и зарубежных изданиях, в том числе - три работы рекомендованных перечнем ВАК, две из них

индексируются в международной базе данных Scopus, одна в Web of Science. Последняя работа является основополагающей для диссертации, также важно, что диссертант является в ней первым автором.

Содержание автореферата и публикаций по результатам работы полностью отражает основные положения диссертации. Заключение и выводы диссертации полностью соответствуют цели и задачам проводившихся исследований, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Результаты, приведенные в диссертации В.В. Мелехова, расширяют наши знания о роли белка Dps – основного архитектурного фактора бактериального нуклеоида *E.coli* во время стационарной фазы роста. Приведенные данные указывают на возможность его неоднородного распределения по бактериальной хромосоме, что имеет большое значения с точки зрения понимания фундаментальных механизмов хранения и реализации генетической информации. Выявленные особенности строения его неорганического ядра заставляют задуматься о возможности расширения понимания роли Dps в бактериальной клетке и его физико-химических свойств. Результаты, связанные с проектированием и получением самособирающихся разветвленных ДНК, а также особенностями локализации на их поверхности додекамеров Dps имеют большую практическую значимость в области биотехнологий, медицины, а также в области нанoeлектроники и спинтроники. Таким образом, результаты диссертационной работы могут быть использованы не только при реализации теоритических курсов в области биофизики, биохимии, молекулярной биологии, но и востребованы на практике.

### **Вопросы и замечания**

1. К недостаткам диссертационной работы и особенно Главы I «Обзор литературы», можно отнести использование автором некоторых фраз и терминов, которые являются транслитерацией иностранной терминологии, кроме того, в обзоре литературы присутствуют некоторые неточности. Например, на стр. 10, реакция восстановления хлорноватистой кислоты, почему-то названа реакцией Фентона. На стр. 17, присутствуют словосочетания «гексамеризации димеров», «тетрамеризации тримеров». В целом понятно, что речь идет об олигомеризации 6 димеров. Справедливости ради, нужно отметить, что недочеты и опiski не оказывают на восприятие работы принципиального влияния.

2. На рис. 40 и 41 (пункт 3.8, с. 93 и далее) приведены распределения размеров частиц белка Dps при действии различных температур. Данные получены методом динамического светорассеяния. Вопрос, почему авторы представляют первичные данные прибора? Измерений проведено много, а никакого обобщения нет. Были ли

зарегистрированы температуры плавления? Например, зарегистрирована ли температурная точка резкого увеличения общего светорассеяния или температуры начальных изменений гидродинамического радиуса? Другим дискуссионным вопросом является присутствие на графиках пика в области 10 мкм, как авторы его интерпретируют?

3. В пункте 3.8 показано, что фрагмент регуляторной области гена *dps S* обладает более высоким сродством к ДНК, однако при оценке константы диссоциации был использован фрагмент регуляторной области гена *dps H* и искусственная, самособирающаяся Y-подобная ДНК. Возникает вопрос, в связи с чем сделан именно такой выбор?

4. На рис. 42 (пункт 3.8, с. 99) приведены интенсивности флуоресценции белка Dps и его нуклеопротеидных комплексов при действии различных температур. Основным трендом является стабильное уменьшение интенсивности при нагреве. Автор полагает, что «такой перепад интенсивности флуоресценции может быть обусловлен высвобождением части олигомеров белка из нуклеопротеидного комплекса Dps-ДНК(S) или за счёт разрыва связей, стабилизирующих нуклеопротеид». Данное утверждение не является убедительным, например, альтернативой может быть медленное окисление триптофана и соответственно потеря интенсивности флуоресценции на выбранных длинах волн. Рассматривал ли автор альтернативные объяснения?

5. В работе приведены результаты оценки характеристик нуклеопротеидных комплексов, которые свидетельствуют о присутствии преимущественно только одной молекулы белка в составе нуклеопротеида. Удавалось ли зарегистрировать присутствие двух и более молекул в составе комплекса? Если нет, то с чем это может быть связано? Будет ли белок также проявлять сродство к концевым и расплетённым участкам ДНК?

6. В работе упоминается возможность прикладного применения исследуемых нуклеопротеидных комплексов, но, тем не менее, автору не удалось получить опытный, пилотный или лабораторный образец изделия на основе спроектированных Y-ДНК и белка Dps. Хотелось бы узнать, с какими затруднениями на практике столкнулся диссертант?

Тем не менее, отмеченные замечания и рекомендации не носят принципиального характера и не снижают научной и практической ценности диссертационной работы В.В. Мелехова.

### **Заключение**

Диссертация Мелехова Владислава Викторовича является самостоятельным и законченным научным исследованием, в котором сформулирован ряд научных положений, являющихся новыми по своей постановке и предлагаемым направлениями решения. Актуальность и научно-практическая значимость работы не вызывает сомнений. Диссертационная работа Мелехова В.В. «Исследование механизмов взаимодействия



мультифункционального белка Dps *Escherichia coli* с ДНК» удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (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)), а ее автор, Мелехов Владислав Викторович, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности - 03.01.02 Биофизика.

Отзыв составлен профессором кафедры биофизики д.б.н. Гудковым С.В.

Отзыв был заслушан и одобрен на заседании кафедры биофизики ННГУ (протокол № 8 от 5 апреля 2018г.)

Заведующий кафедрой  
биофизики ННГУ им. Н.И. Лобачевского.  
доктор биологических наук, доцент

Воденев В.А.

603950, Россия, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, к. 1

ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского" (ННГУ)

e-mail: [ibbm@unn.ru](mailto:ibbm@unn.ru)

тел.: +7 (831) 462-32-02

