

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 темы исследования. Диссертация Мелехова Владислава Викторовича посвящена изучению взаимодействия белка Dps *E.coli* с фрагментами ДНК. Это белок известен уже около 25 лет и помимо конденсации бактериального генома на стационарной фазе роста и в условиях различного стресса в клетке выполняет еще ряд различных функций, в том числе окисляет ионы двухвалентного железа и депонирует продукты этой реакции внутрь соевой полости, в ходе окисления Dps использует перекись водорода, снижая тем самым эффективность реакции Фентона, а также экранирует ДНК от прямого повреждения радиоактивного воздействия, УФ-облучения и др. Помимо этого есть предположения, что за счет взаимодействия с ДНК Dps может участвовать в процессе регуляции экспрессии некоторых генов. Своим названием он обязан способности взаимодействовать с ДНК (DNA-binding protein of starved cells), однако сам механизм этого взаимодействия до сих пор остается до конца непонятным. Поэтому исследование механизмов образования нуклеопротеидных комплексов с участием белка Dps является важной фундаментальной задачей не только с точки зрения понимания механизмов упаковки генетического материала *E.coli*, но и с точки зрения роли этого белка в ряду других клеточных процессов. Кроме того, в работе показаны возможности использования как непосредственно белка Dps, так и его комплексов, в области прикладных исследований и технологий для создания молекулярных конструкций с заданной структурой и свойствами. Таким образом поставленная в диссертационной работе цель и задачи являются на данном этапе вполне

актуальными и логичными, поскольку позволяют провести оценку особенностей непосредственно молекул белка Dps и комплексов сформированных с его участием.

Общая характеристика работы. Диссертация Мелехова В.В. изложена в традиционном стиле на 136 страницах машинописного текста, состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа хорошо иллюстрирована и содержит 44 рисунка и 3 таблицы. Список литературы включает 220 цитируемых научных работ, 208 из которых относятся к зарубежным.

Во введении автор обосновывает актуальность темы, цели и задачи исследования, приводит данные о научной новизне и практической значимости работы.

Первая глава состоит из семи подразделов и посвящена описанию и критическому анализу известных на сегодня данных о белке Dps, его структуре, особенностях организации ферроксидазных центров, а также моделей взаимодействия с ДНК. Кроме того, в первой главе приведено описание технологии ДНК-оригами, с помощью которой можно создавать двумерные и трёхмерные ДНК-конструкции, а также полученные данные с использованием такого подхода для белков суперсемейства ферритинов и Dps в области полупроводниковой техники, медицины и материаловедения. Обзор чётко изложен и в полной мере отражает современные представления в данной области знаний.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» автор приводит подробную характеристику объектов, а также методов исследования. Спектр использованных биофизических, биохимических, молекулярно-биологических и физических методов исследования включает атомно-силовую микроскопию, поверхностный плазмонный резонанс, динамическое светорассеяние, флуоресцентную и XANES-спектроскопию, хроматографическое и электрофоретическое фракционирование биомакромолекул, ПЦР, радиоавтографические исследования и др.

свидетельствуют о высоком научно-техническом уровне, как самого диссертанта, так и об адекватности и достоверности полученных им результатов.

Третья глава посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению. В ней описывается физико-химические свойства и морфология белка Dps, фрагментов ДНК и комплексов на их основе, полученная различными методами, в том числе с использованием модельных подходов. Выявленные зависимости свидетельствуют от том, что, в целом, фрагмент регуляторной области гена *dps* склонен к формированию анизотропных изгибов двойной спирали. Однако моделирование составных частей фрагмента регуляторной области гена *dps* (фрагменты *S* и *H*), обладающих сопоставимой друг с другом длиной (254 и 214 п.н. соответственно) выявило их низкую склонность к формированию изгибов двойной спирали. Данные модельных экспериментов впоследствии были подтверждены с помощью атомно-силовой микроскопии и далее были использованы в исследованиях в качестве модели линейных участков ДНК.

При помощи флуоресцентной спектроскопии и метода динамического светорассеяния изучено поведения исследуемых образцов в широком диапазоне температур, что позволило сделать о большей термостабильности нуклеопротеидных комплексов, полученных с использованием Dps относительно чистого раствора белка. Метод поверхностного плазмонного резонанса позволил автору количественно оценить константу диссоциации белка Dps с искусственным, самособирающимся фрагментом ДНК и с фрагментом из регуляторной области гена *dps*. На основании проведенных исследований автором делает вывод о более высокой стабильности комплекса с Y-подобной ДНК, так как ее константа диссоциации почти на порядок выше. Результаты регистрации и анализа XANES-спектров свидетельствуют о том, что неорганическое ядро имеет более сложный состав, чем представлялось ранее и почти на две трети состоит из Fe_3O_4 и на треть из FeO. На основании всех этих данных, а также результатов

исследований атомно-силовой микроскопии автором была предложена модель взаимодействия белка Dps с ДНК, согласно сродство Dps к разветвленным участкам ДНК обусловлено возможностью формирования большего количества связей и, таким образом, является более термодинамически устойчивым.

В «Заключение» автор предпринимает попытку совокупного анализа полученных данных в рамках диссертационной работы и выдвигает гипотезы, которые позволят в дальнейшем расширить представления о функциональной роли белка Dps в ряде важных клеточных процессов. Помимо этого, проведенное Мелеховым В.В. обобщение полученных результатов позволяет сделать положения, выносимые на защиту более логичными и обоснованными.

Научная новизна исследования. В рамках диссертационной работы был проведен подробный анализ данных XANES-спектров, зарегистрированных для подложки, содержащей молекулы Dps в условиях неразрушающих его олигомерной структуры. Полученные данные свидетельствуют о том, что в составе неорганического ядра Dps содержатся атомы железа в различном зарядовом состоянии (36,4% FeO и 63,6% Fe₃O₄). В результате анализа морфологии отдельных нуклеопротеидных комплексов с использованием АСМ был выявлен новый способ взаимодействия Dps с ДНК, при котором белок предпочтительно взаимодействует с концевыми участками сахаро-фосфатного остова в случае взаимодействия с линейным участком ДНК. Исследование морфологических характеристик отдельных нуклеопротеидных комплексов выявило еще один новый способ взаимодействия Dps с ДНК, при котором молекула додекамера локализуется в области ветвления ДНК, а константа связывания Dps с такими структурами почти на порядок выше. Таким образом, результаты представленные Мелеховым В.В. в диссертационной работе расширяют понимание особенностей функционирования додекамера Dps и его роль в таком глобальном процессе как обеспечение сохранности генетического материала.

В целом, содержание работы, её оформление и завершённость заслуживают высокой оценки. Автореферат полностью отражает содержание диссертации и опубликованных в работ. По теме диссертации автор имеет 3 статьи в рекомендуемых ВАК зарубежных и отечественных журналах, а также 9 тезисов в сборниках конференций.

Обоснованность выводов работы обеспечены хорошей осведомленностью автора в современном состоянии исследований в предметной области, о чем свидетельствует качественно и логично составленный обзор литературы. А достоверность результатов хорошо подкреплена разнообразием и надежностью используемых методов для решения задач, поставленных в рамках диссертационной работы.

Научно-практическая значимость работы определяется тем, что полученные результаты не только добавляют понимание кинетических и физико-химических механизмов конденсации ДНК *E.coli*, но и возможностью применения этих результатов для решения прикладных задач молекулярного дизайна. В целом, диссертационная работа Мелехова В.В., является законченным научным исследованием. Она содержит новые результаты в области биофизики, биохимии и молекулярной биологии, которые представляют научный интерес для широкого круга исследователей, а также вопросами прикладного использования биомакромолекул в различных отраслях реального сектора экономики.

Однако работа не лишена некоторых замечаний и вопросов, в частности:

1. Не смотря на то, что обзор литературных данных составлен достаточно понятно и логично, автором в некоторых разделах используются достаточно длинные предложения, что иногда вызывает затруднения при чтении, но это не нарушает целостности и значимости излагаемого материала.

2. Также имеется замечание технического характера к рисункам, приведенным в Главе I, в частности Рис. 5 (стр. 18) содержит достаточно

большое количество мелких деталей и подписей, что снижает информативность рисунка при беглом прочтении.

3. На Рис. 27 (стр. 68) приведена гистограмма распределения высоты наблюдаемых частиц, однако количество этих частиц не очень большое, хотелось бы получить пояснение, с чем связан выбор именно этой области, для оценки размеров частиц и почему не проведена оценка их ширины. статистика

4. Раздел 3.6 посвящен проектированию и исследованию искусственных разветвлённых структур ДНК, в качестве мишени для Dps. На Рис. 38 автор приводит результаты взаимодействия белка Dps Y-ДНК и обращает внимание на то, что в растворе, содержащем разветвленные молекулы ДНК, присутствуют как дуплексы, так и триплексы олигонуклеотидов. Возникает вопрос, проводилась ли оценка эффективности сборки такой ДНК при поэтапном добавлении каждого олигонуклеотида по отдельности.

5. Автору удалось спроектировать несколько Y-подобных структур ДНК и получить их образцы для исследований, но возникает вопрос о том, насколько перспективен такой подход для создания конструкций более высокого порядка и будет ли сохраняться закономерность локализации в их составе додекамеров Dps.

Тем не менее, имеющиеся в работе отдельные недостатки не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку 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».

Ведущий биоинформатик

со степенью кандидата физико-математических наук

Службы заместителя генерального директора по науке

обособленное подразделение с. Малобыково

Общества с ограниченной ответственностью «Инновационный центр «Бирюч – новые технологии» (специальность – «Биофизика»)



Артем Валерьевич Кабанов

06.04.2018

ООО «ИЦ «Бирюч-НТ»

309927, Белгородская обл., с. Малобыково, ул. Белая Вежа, д.1

Тел. +7 906 751-06-57

E-mail: a.kabanov@brc.efko.ru

«Подпись Кабанова А.В. удостоверяю»

менеджер по персоналу

Службы персонала обособленное подразделение с. Малобыково

ООО «Инновационный центр «Бирюч-новые технологии» (ПК ЭФКО)



Ю.А. Науменко

06.04.2018