

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Антипова Сергея Сергеевича

«Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного микроокружения и комплексирования с ДНК», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Актуальность исследования. Известно, что все живые организмы используют специальные структурные белки для сохранения своего генома в функционально активном состоянии в различных условиях и на различных этапах роста. У высших организмов эту функцию выполняют гистоны. Прокариотические клетки не имеют в своем составе классических гистонов и их функцию выполняют специальные белки, которые способны формировать нуклеопротеидные комплексы с ДНК за счёт распознавания структурных особенностей двойной спирали или специфических нуклеотидных последовательностей бактериальной хромосомы. Во время роста клеток *E.coli* их количество и соотношение изменяются в зависимости от фазы роста, а также при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды. К таким белкам относится Dps (ДНК-связывающий белок стресса голодания), который является основным белком, отвечающим за формирование компактного нуклеоида во время стационарной фазы роста бактерии или в условиях недостатка питательных веществ. Следует отметить, что роль Dps не ограничивается защитой от стресса голодания. Например, в патогенных клетках *Salmonella enterica* этот белок и его аналоги способствуют сопротивлению защитным механизмам клеток-хозяев.

Помимо этого, Dps можно отнести к ферритин-подобным белкам, так как он способен окислять токсичные для живых клеток ионы двухвалентного железа и накапливать продукты окисления внутри своей полости. Эта функция Dps сопряжена с еще одним важным механизмом, так как в процессе окисления Fe^{2+} Dps может использовать перекись водорода, снижая тем самым эффективность реакции Фентона, тем самым выполняя

антиоксидантную функцию. Справедливости ради, стоит отметить, что этот белок может использовать и кислород для окисления ионов железа, аналогично классическим ферритинам, но эффективность этой реакции значительно ниже, чем при использовании H_2O_2 . Способность взаимодействовать с ДНК дает основания предполагать, что помимо защитной функции, Dps может оказывать влияние на экспрессию некоторых генов. Однако отсутствие в его структуре модулей, способных распознавать конкретные нуклеотидные последовательности, а также экспериментальных данных о способах его распределения по бактериальной хромосоме не позволяют однозначно утверждать о выполнении Dps функции регуляторного элемента.

Детальный механизм взаимодействия Dps с ДНК активно изучается, но до конца не выяснен. Существуют данные, свидетельствующие о том, что клетки *E.coli* после 48-ми часового голодания способны формировать кристаллическую структуру ДНК в комплексе с молекулами Dps. Тем не менее, на основании имеющихся данных электронной микроскопии не представляется возможным ответить на вопрос о локализации и форме укладки ДНК в составе нанокристалла в комплексе с Dps, в виду этого, предположения о её конформации остаются гипотезами. Существующие модели взаимодействия Dps с ДНК не могут полностью объяснить механизм их взаимодействия. Остается также малопонятным механизм обратного перехода бактериального нуклеоида из кристаллического состояния при возвращении клеток *E.coli* к условиям нормального роста. Более того, до конца не понятен и сам механизм реализации генетической информации при нахождении нуклеоида в состоянии нанокристалла. Принимая во внимание вышеизложенное, можно утверждать, что актуальность и научная значимость диссертационной работы Антипова С.С., целью которой являлось изучение закономерностей конденсации бактериальной ДНК с участием белка Dps в зависимости от природы микроокружения и выявление закономерностей распределения этого белка по бактериальной хромосоме, не вызывают сомнений.

Общая характеристика работы. Диссертационная работа Антипова С.С. имеет традиционную структуру и содержит введение, обзор литературы, методическую часть, полученные результаты и их обсуждение, заключение,

выводы, приложения, список сокращений и список цитируемой литературы. Диссертация изложена на 425 страницах машинописного текста, включая приложения. Диссертация содержит 7 таблиц и 64 рисунка. Список литературы включает 334 источника, из которых 315 зарубежных.

Обзор литературы диссертационной работы состоит из 8 основных разделов, некоторые из которых содержат более мелкие подразделы, посвященные конкретным вопросам. В завершении Главы I содержится обобщение литературных данных. Разделы обзора литературы содержат основные сведения о составе бактериального нуклеоида, его компонентах и архитектуре, основных функциональных свойствах белка Dps. Показана взаимосвязь белка Dps с суперсемейством белков – ферритинов и приведены данные о трехмерной структуре нативного Dps, его мономеров и особенностях их олигомеризации. Также, приведены имеющиеся на сегодня данные о строении ферроксидазного центра Dps и каналов транслокации ионов железа. Помимо этого, в литературном обзоре проведен критический анализ существующих моделей взаимодействия Dps с ДНК. Отдельное внимание автор уделит участию Dps в таких клеточных процессах как регуляция экспрессии генов и формированию стрессовой устойчивости клеток *E.coli*. Более того, в отдельный раздел вынесены сведения о перспективах прикладного использования как молекул ферритинов, так и Dps в частности, и проанализированы данные о существующих на сегодня результатах создания наноразмерных устройств и конструкций на основе молекул белка и его нуклеопротеидных комплексов. В завершении рассмотрения раздела, посвященного прикладным исследованиям и разработкам, автор приводит интересные сведения о технологии «ДНК-оригами», разработанной Н. Зиманом. Этот способ проектирования и создания конструкций наноразмерного диапазона позволяют получать двумерные и трехмерные конструкции ДНК заданной конфигурации, что может оказаться чрезвычайно перспективным при проектировании и создании конструкций, содержащих олигомеры Dps. Несмотря на объем и разносторонность аспектов, рассмотренных в литературном обзоре, его разделы достаточно логично взаимосвязаны, что позволяет проследить основную мысль и понять какие основные вопросы ставит перед читателем автор.

Глава II посвящена описанию методической части работы и объекта исследования. В работе используется достаточно широкий набор современных физических, биофизических, биохимических, молекулярно-биологических методов исследования: различные виды хроматографического фракционирования биомакромолекул (включая высокоэффективную жидкостную хроматографию) и электрофоретического фракционирования молекул белка, ДНК и их комплексов, аналитического ультрацентрифугирования, радиоавтографии, атомно-силовой микроскопии, спектральных методов анализа, динамического светорассеяния, поверхностного плазмонного резонанса, просвечивающей электронной микроскопии, XANES-спектроскопии, Мёссбауэровской спектроскопии. Помимо этого, в диссертационной работе был использован достаточно широкий спектр модельных подходов для биоинформатического анализа, а для моделирования взаимодействия Dps с лигандами различной природы был использован метод последовательного молекулярного докинга. Для оценки уровня экспрессии генов в различных условиях применялся ПЦР в реальном времени, а также система репортерной детекции, сконструированная с использованием белка GFP. Следует отметить, что методы, используемые в работе, достаточно подробно описаны, что важно, поскольку позволит заинтересованным исследователям воспроизвести все необходимые экспериментальные условия.

Глава III посвящена полученным результатам и их обсуждению. Глава III диссертационной работы содержит три блока исследований. Первый (п. 3.1 – 3.7) посвящен аттестации полученного препарата рекомбинантного белка Dps, изучению его физико-химических свойств и факторов, влияющих на его олигомерную структуру. Во втором блоке (п. 3.8 – 3.14) диссертант проводит поиск мишени ДНК, обладающей высоким сродством к Dps, используя для этого фрагменты ДНК различного нуклеотидного состава и структуры. В результате оценки факторов, влияющих на это сродство, автор показывает возможность проектирования и создания Y-подобных самособирающихся молекул ДНК наноразмерного диапазона, а также проводит оценку возможности управляемой иммобилизации олигомера Dps в составе таких ДНК-структур. Помимо этого, во втором блоке исследований проведено изучение термодинамических параметров нуклеопротеидных

комплексов, образованных Dps с различными по структуре и составу участками ДНК при воздействии температуры, а также проведена экспериментальная оценка и сопоставление констант связывания Dps с линейным фрагментом H и Y-подобной ДНК. В завершении, на основании полученных результатов, автор предлагает модель взаимодействия белка Dps с линейными и разветвленными участками бактериальной хромосомы. Третий блок результатов (п. 3.15 – 3.19) посвящен изучению закономерностей распределения белка Dps по бактериальной хромосоме, поиску и анализу нуклеотидных последовательностей его сайтов связывания в бактериальной хромосоме, а также оценке влияния Dps на экспрессию конкретных генов в различных условиях. Для этого автор использует широкий спектр биоинформатических и экспериментальных подходов. В заключении диссертант суммирует полученные результаты и проводит их анализ, на основании которого формулирует рекомендации по возможным направлениям дальнейших исследований и обосновывает выводы диссертационной работы.

Значимость для науки и практики. Результаты диссертационной работы носят междисциплинарный характер и расширяют фундаментальные представления о физико-химических свойствах белка Dps и его неорганического ядра, механизмах формирования нуклеопротеидных комплексов и особенностях распределения Dps по бактериальной хромосоме. Помимо этого, результаты исследования имеют перспективное и важное прикладное значение, поскольку фундаментальные знания о факторах, влияющих на олигомерный статус Dps, составе его неорганического ядра, особенностях взаимодействия Dps с различными участками ДНК могут позволить создавать молекулярные конструкции наноразмерного диапазона с заданными свойствами и пространственной организацией. Таким образом, эти результаты можно использовать при проведении различных прикладных исследований и разработок, например, в области медицины, нанoeлектроники и биотехнологии.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Результаты диссертации следует использовать при разработке учебных курсов и рабочих программ по различным направлениям биофизики, биохимии и молекулярной биологии, а также различных

междисциплинарных курсов и спецкурсов. Это позволит расширить фундаментальные представления о реализации клеточных процессов, их согласованности и о функциональной роли Dps в клетке. Помимо этого, результаты диссертационной работы могут стать хорошей основой для формирования представлений о возможных направлениях прикладных исследований у студентов и аспирантов, изучающих эти курсы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертантом получены новые и оригинальные результаты, важные как для фундаментальной науки, так и для прикладных исследований. 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 подготовлена 31 публикация в научных изданиях, из которых 11 – в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий рекомендованных ВАК РФ, из которых 6 индексируются МБД Scopus и 6 в МБД Web of Science, а также подано две заявки на защиту объектов интеллектуальной собственности.

Личный вклад автора диссертации состоял в проведении всех экспериментов и исследований в рамках диссертационной работы: по выделению и очистке рекомбинантного белка Dps (методы хроматографического фракционирования), фрагментов ДНК (ПЦР, электрофоретическое фракционирование), оценке сродства Dps к ДНК (метод EMSA), оценке термодинамических характеристик (динамическое светорассеяние, поверхностный плазмонный резонанс), оценке морфологических характеристик отдельных молекул ДНК, белка Dps и их комплексов (атомно-силовая микроскопия), подготовке проб и регистрации XANES-спектров и др., обработке, анализе и интерпретации полученных результатов, написании научных статей и других публикаций и апробации полученных результатов.

Работа, однако, не лишена замечаний:
1. В диссертационной работе для решения сложной задачи – изучения

структурных характеристик белка ДПС используется много экспериментальных методов. Обратимся к методу XANES. Автор полагает, что предложенный им метод пробоподготовки образцов позволяет исследовать образец, аналогичный нативному. В процессе пробоподготовки образец ДПС сначала наносится на кристаллический кремний, затем подвергается трехнедельной дегидратации. Обе эти процедуры, даже без помещения образца в сверхвысокий вакуум, могут привести к частичной деградации образца и, соответственно, к некому относительному изменению количества ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} в исследуемом на XANES образце по отношению к нативному. Никаких аргументов, почему при такой процедуре не происходит деградации образцов и, соответственно, относительного изменения количества ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} в диссертации не приведено.

2. Мессбауэровская спектроскопия. Приведен очень малоинформативный мессбауэровский спектр при 77К. Автор полагает, что полученные значения δ и ΔE_Q характерны для сферических наночастиц магнетита (Fe_3O_4) диаметром 10 нм в парамагнитном состоянии. Как можно утверждать по приведенному спектру, что он относится к магнетиту Fe_3O_4 , а диаметр частиц равен 10 нм? Чтобы утверждать и то, и другое надо снять спектр при температуре близкой к 4 К. Тогда может проявиться спектр магнитоупорядоченного магнетита. Для совсем маленьких частиц размером 2-3 нм даже такое понижение температуры может не помочь.

3. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). В литературе много данных по изучению строения белка ДПС с помощью ПЭМ. Обычно, при разрешении, которое используется в данной работе, хорошо виден сам белок ДПС. В настоящей работе белка не видно, видно лишь внутреннее содержимое белка ДПС. Поэтому нужно делать особый акцент на пробоподготовке образца, которая позволяет увидеть внутреннее содержимое образца.

4. Метод последовательного молекулярного докинга. В работе приведены результаты молекулярного моделирование структуры белка Dps в присутствии FeO и Fe_2O_3 . Кроме этого, приведены результаты молекулярного

докинга α -D-глюкозы, D-галактуроната, D-глюкуроната с додекамером Dps. Критически оценить применение данного метода в работе и, соответственно, возможные ошибки, возникающие при его применении, невозможно. Дается ссылка на использование пакета программ Autodock VINA. Однако, какие конкретно программы из этого пакета брались - непонятно.

5. В диссертации и автореферате, для наглядности, следовало бы привести блок-схему, отражающую алгоритм биоинформатического анализа данных, полученных в ходе экспериментов, связанных с поиском и характеристикой областей связывания белка Dps в бактериальной хромосоме.

6. Автору следовало бы провести сопоставление полученных результатов о неравномерном распределении Dps по бактериальной хромосоме на экспоненциальной фазе роста, с возможностью его участия в формировании на стационарной фазе роста *E.coli* нанокристаллов Dps-ДНК. Такое сопоставление могло бы значительно украсить работу.

7. К техническим замечаниям можно отнести следующие. Недостаточен список используемых сокращений. В диссертации имеются опечатки: стр. 26, второй абзац, четвертое предложение; стр. 32 второй абзац, второе предложение; стр. 61 первый абзац, последнее предложение; стр. 87 первый абзац, первое предложение; стр. 90 в названии раздела 2.23; стр. 107 первый абзац, второе предложение; стр. 115 последнее предложение; стр. 162 последнее предложение; стр. 174 подпись к рисунку 51; стр. 197 первый абзац второе предложение.

Заключение. Приведенные выше замечания и пожелания не влияют на качество диссертационной работы Антипова С.С., носят преимущественно рекомендательный характер и могут быть учтены автором при подготовке доклада. Диссертационная работа Антипова Сергея Сергеевича «Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного микроокружения и комплексования с ДНК» является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и имеет большое научное и практическое значение. По актуальности

изучаемой проблемы, научной новизне, практической значимости и обоснованности выводов представленная работа соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, (ред. от 28.08.2017), предъявляемым ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор – Антипов Сергей Сергеевич заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Доктор физико-математических наук (Научная специальность 01.04.17 – Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества),
Руководитель Отдела строения вещества
ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН



Крупянский Юрий Федорович

Собственноручную подпись 11.05.2018
сотрудника *Крупянского Ю. Ф.*
удостоверяю
секретарь *В.И.*

Адрес:

ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
отдел строения вещества, лаборатория динамики биополимеров
119991 Москва, ул. Косыгина 4
Тел: +74959397300,
факс: +74956512191
E-mail: yufk@chph.ras.ru
Адрес в Интернете: <http://www.chph.ras.ru/>