

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта РАН
(ИМБ РАН)

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д.32
Телефон: 8(499)135-23-11
8(499)135-11-60
Факс: 8(499) 135-14-05
e-mail: isinfo@imb.ru
http://www.imb.ru/

ОКПО 0269, ОГРН 1037736018066
ИНН/КПП 7736055393/ 773601001
27.09.2018 № 1248-227
На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по науке
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии
им. В.А Энгельгардта РАН
д.б.н., профессор, член-корреспондент
РАН В.Л. Карпов



09. 2018

ОТЗЫВ

Отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А Энгельгардта РАН Российской академии наук о диссертационной работе **Антипова Сергея Сергеевича** «Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного микроокружения и комплексования с ДНК», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности – 03.01.02 биофизика.

Актуальность темы исследования.

В диссертационной работе Антипова С.С. проведено разностороннее, междисциплинарное исследование физико-химических свойств белка Dps, особенностей его взаимодействия с ДНК, и распределения Dps по бактериальной хромосоме. В результате проведенных экспериментов и анализа полученных данных выявлено, что присутствие в неорганическом ядре Dps атомов железа в двух- и трехвалентном состояниях стимулируют формирование додекамера Dps. Такие результаты являются достаточно неожиданными, так как ранее считалось, что этот белок, аналогично классическим ферритинам, способен аккумулировать только ионы Fe(III). Помимо этого показано, что D-глюкуронат способен оказывать модулирующее воздействие на ДНК-связывающую активность Dps. Это позволило автору расширить представление о влиянии компонентов питательной среды на функциональную активность Dps и показать возможность участия сахаров в ремодуляции транскрипционно малоактивного, максимально компактизованного нуклеоида стационарно растущих клеток *E.coli*. Результаты сопоставления сродства Dps к участкам ДНК различного нуклеотидного состава свидетельствует о том, что эффективность его взаимодействия не одинакова, следовательно, в хромосоме *E.coli* могут присутствовать потенциальные мишени для взаимодействия с Dps, обеспечивающие его неравномерное распределение на экспоненциальной фазе роста, при относительно малом количестве молекул этого белка.

При изучении морфологии комплексов, сформированных Dps с линейными и самособирающимися Y-подобными конструкциями ДНК, в рамках диссертационной работы, охарактеризованы два новых способа расположения олигомеров Dps: на концевых участках линейных фрагментов ДНК и в точке ветвления Y-подобных ДНК. Сравнение термодинамических параметров комплексов, сформированных Dps с такими молекулами ДНК

свидетельствует о том, что присутствие Y-ДНК увеличивает термостабильность нуклеопротеида, а экспериментально установленная константа связывания Dps с разветвленными конструкциями выше, чем с линейными фрагментами ДНК. Оценка особенностей локализации Dps в структуре Y-подобных ДНК позволила выявить возможность влияния структуры ДНК на расположение олигомера Dps в составе комплекса.

На основании данных, свидетельствующих о различном родстве Dps к разным фрагментам ДНК, диссертантом проведен полногеномный поиск его сайтов связывания, который подтвердил гипотезу о наличии у Dps некоторых предпочтений к определённым участкам генома, которую автор склонен объяснить структурной специфичностью. Установлено, что нуклеотидные последовательности сайтов связывания Dps имеют общие участки с сайтами для других белков нуклеоида, часто обнаруживаются в REP-элементах, «*промоторных островках*» и имеют повышенную, по сравнению с теоретически рассчитанной, частоту встречаемости инвертированных повторов. Экспериментальное тестирование регуляторной функции Dps обнаружило ряд значимых фактов, свидетельствующих в пользу участия Dps в регуляции экспрессии генов. Приводимые в данной работе доказательства, полученные разносторонними методами исследований, позволяют более глубоко понять механизмы хранения генетической информации. Учитывая тот факт, что Dps является не только основным архитектурным фактором бактериального нуклеоида, но и выполняет функцию, аналогичную ферритинам, новые данные о строении его неорганического ядра, полученные в рамках диссертации, заставляют пересмотреть функциональную роль и значение данного белка в бактериальных клетках. Помимо этого, принимая во внимание литературные данные, приведённые автором диссертации в литературном обзоре о возможности прикладного использования молекул Dps и нуклеопротеидных комплексов, полученных с его участием, открывают ещё одно, немаловажное направление применения полученных данных. Таким образом, актуальность рецензируемой работы не вызывает сомнения.

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа изложена на 425 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц, 64 рисунка и содержит стандартные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, полученные результаты и их обсуждение, заключение, выводы, а также список литературы, содержащий 334 источника и приложения к диссертации.

Во вводной части Антипов С.С. формулирует актуальность работы, ставит конкретную цель и задачи исследования, описывает новизну, теоретическую и практическую значимость, и представляет положения, выносимые на защиту. Стоит отметить, что цели и задачи четко сформулированы и понятны. Помимо этого во введении отражена возможность прикладного использования белка Dps и конструкций наноразмерного диапазона с его использованием. Это позволяет автору хорошо аргументировать целесообразность этапов выполняемых исследований.

Обзор литературы, представленный в работе, представлен в виде одной главы, содержащей 16 разделов. В этих разделах диссертационной работы автор суммирует и обобщает имеющиеся на сегодня данные о компонентах бактериального нуклеоида и их роли, структурной организации Dps, особенностях строения его ферроксидазного центра, способах окисления ионов железа, теоретических моделях, описывающих взаимодействия Dps с ДНК, а также рассматривает возможность участия Dps в других клеточных процессах. В отдельном разделе обзора литературных данных приведены результаты практического использования, как ферритинов в целом, так и белка Dps в частности, для решения конкретных прикладных задач. Литературные данные использованы автором в полном объеме для обоснования целесообразности исследования.

Раздел «**Материалы и методы исследования**» (Глава II) включает 33 пункта, в которых детально описаны все использованные методы и подходы. К ним относятся

широкий перечень биофизических, биохимических, молекулярно-биологических, биоинформатических и физических методов исследований. Специального внимания заслуживает их оригинальное сочетание, в частности применение XANES-спектроскопии в условиях неразрушающих олигомер белка. Использование такого широкого методологического спектра позволило автору провести разносторонние исследования и получить комплексные результаты.

Глава III **Полученные результаты и их обсуждение** содержит несколько взаимосвязанных разделов, отражающих логику проведения исследований для достижения поставленной цели. Данная глава состоит из 19 подразделов, в которых подробно изложены и проиллюстрированы все выносимые на защиту положения.

Отправной точкой исследований в рамках диссертационной работы послужили данные о позитивном влиянии электромагнитного излучения (ЭМИ СВЧ) низкой интенсивности (1 мкВт/см^2) на внутриклеточное содержание мРНК гена *dps*, что позволяет сделать заключение о возможности участия его белкового продукта в формировании адаптивного ответа за счет способности взаимодействовать с ДНК. Поэтому на следующем этапе автором был получен препарат рекомбинантного белка Dps, проведена его аттестация и изучены физико-химические свойства. Результаты физико-химической аттестации препарата свидетельствуют о том, что все основные параметры соответствуют литературным данным (размер олигомера составляет 7-10 нм, максимум спектра его флуоресценции имеет традиционный вид с максимумом в области 332 нм). Однако использованием XANES-спектроскопии доказано присутствие в составе неорганического ядра Dps *E.coli* ионов не только трехвалентного железа, как считалось ранее, но и ионов Fe^{2+} , которые находятся в тетра- и октаэдрическом окружении атомами кислорода. Наличие более сложного состава неорганического ядра подтвердили и результаты, полученные с использованием Мёссбауэровской спектроскопии. Помимо этого, в диссертации Антипова С.С. показано, что присутствие ионов железа оказывает влияние на олигомерную форму Dps, стабилизируя его додекамер *in vitro*, а в результате последовательного молекулярного докинга были выявлены потенциальные сайты связывания в структуре додекамера Dps для Fe_2O_3 . Таким образом, в диссертационной работе убедительно доказано, что строение неорганического ядра Dps имеет более сложный состав, чем обсуждалось ранее в литературе, а представления о функциональных характеристиках Dps могут быть расширены.

На следующем этапе был осуществлен поиск фрагментов ДНК, обладающих наибольшим сродством к Dps, и сначала для этих целей были использованы фрагменты ДНК, содержащие частично или полностью регуляторную область гена *dps*, а также АТ-богатые, но транскрипционно неактивные фрагменты ДНК, содержащие так называемые «*промоторные островки*». Полученные данные свидетельствуют о том, что Dps взаимодействует со всеми использованными фрагментами ДНК. Однако эффективность наблюдаемого взаимодействия в ходе экспериментов *in vitro*, в отсутствие какой-либо конкуренции со стороны других компонентов бактериальной клетки, была разной. Это подразумевает наличие способности у молекул белка распознавать особенности структуры ДНК. Такое предположение получило некоторое подтверждение в результате оценки эффективности взаимодействия Dps с фрагментами ДНК регуляторной области собственного гена в условиях конкуренции за белок. В результате было установлено, что в условиях конкуренции фрагмент ДНК, содержащий функциональный промотор, имеет большее сродство к Dps, чем дистальная часть регуляторной области. Это свидетельствовало о наличии в бактериальной хромосоме, сайтов предпочтительного связывания Dps, что может быть значимым при конденсации нуклеоида, обеспечивая упорядоченность всего процесса, которую ранее не могла объяснить ни одна из теоретических моделей взаимодействия Dps с ДНК. Поэтому далее автор предпринял попытку локализовать сайты связывания Dps в регуляторной области собственного гена с использованием метода ДНКазного футпринтинга. Этот эксперимент оказался результативным и свидетельствовал о способности Dps играть роль регуляторного белка.

Проверка этого предположения была сделана с использованием фрагментов «*промоторных островков*», которые содержат избыточное число промоторов и участвуют в адаптации генов, полученных в результате горизонтального переноса. «*Промоторные островки*» находятся в постоянном контакте с еще одним белком бактериального нуклеоида H-NS, который является специфическим супрессором экспрессии чужих генов. В результате впервые было зарегистрировано негативное влияние H-NS на «*островковую*» транскрипцию, но делеция гена *dps* вызвала разнонаправленное изменение транскрипционной активности в разных островках. «*Промоторные островки*», следовательно, могут быть не только предметом целенаправленной гетерохроматизации, но и специфической регуляции.

Результатом анализа морфологических особенностей комплексов, сформированных Dps с линейными участками ДНК, с использованием атомно-силовой микроскопии было обнаружение его преимущественной локализации на концевых участках ДНК. Формируя бинарные комплексы с линейными фрагментами, Dps, следовательно, выбирал в качестве мишеней, локально денатурированные концевые участки двухцепочечной ДНК. На основании этих данных диссертантом были спроектированы и получены разветвленные Y-подобные молекулы ДНК различного нуклеотидного состава и структуры, моделирующими такие участки ДНК. Результаты атомно-силовой микроскопии выявили расположение додекамеров Dps преимущественно в точке ветвления Y-ДНК, причем введение некомплементарных участков в структуру таких молекул приводило к смещению белка в их сторону. Электрофоретическое фракционирование смеси, полученной при самосборке искусственных Y-ДНК, свидетельствует о том, что Dps обладает большим сродством к ДНК-триплексами, а не дуплексами. Затем аналогичный эксперимент был проведен с использованием кольцевой плазмиды в нативном состоянии и после обработки сайт-специфической нуклеазой. Плотность расположения Dps оказалась больше на никированной плазмиде по сравнению с нативной, и в образцах с фрагментированной плазмидой, в большинстве случаев располагался на концах двойной спирали. Такие результаты привели автора к мысли о необходимости оценки термодинамических параметров комплексов Dps-ДНК. Анализ полученных данных позволил диссертанту сделать вывод о том, что стабильность нуклеопротеидного комплекса, образованного Dps с разветвленным фрагментом ДНК (в частности, с Y5-Y6-Y7), обладает большей устойчивостью к воздействию повышенной температуры по сравнению с нуклеопротеидным комплексом полученные с использованием линейного фрагмента ДНК.

Особое значение имеют данные о зависимости олигомерной формы Dps от интермедиатов сахарного метаболизма D-глюкуроната и D-галактуроната, в присутствии которых был обнаружен распад додекамера до ди- или тримеров. Это важно, т.к. позволяет понять, каким образом конденсированный белком Dps до состояния нанокристалла в условиях голодания нуклеоид, может быть ремоделирован при переходе клеток к активному росту. Суммируя полученные на этом этапе результаты, автор формулирует и обосновывает модель, учитывающую термодинамические и структурные особенности взаимодействия Dps с ДНК различной структуры, за счет формирования максимального числа контактов олигомера Dps с ДНК, обеспечивающих максимальную термодинамическую стабильность образованной структуры.

Для масштабной проверки этой модели был осуществлён полногеномный поиск сайтов связывания Dps в клетках *E.coli*. Учитывая, что максимальное количество этого белка, согласно литературным данным, зарегистрировано на стационарной фазе роста (~180000 молекул на клетку), и практически вся бактериальная хромосома занята Dps, автор проводит данный эксперимент на экспоненциальной фазе роста. В результате, впервые было документировано неравномерное распределение Dps по бактериальной хромосоме. При этом установлено, что сайты его связывания, перекрываются с сайтами связывания других белков бактериального нуклеоида, выявленные другими авторами, а максимальное перекрывание областей взаимодействия Dps зарегистрировано для сайтов белка Fis, который играет определяющую роль в архитектуре бактериального генома на экспоненциальной фазе роста.

Это послужило основанием для оценки способности Dps оказывать влияние на экспрессию генов, ассоциированных с местами контакта, и оказалось, что удаление гена *dps* приводит к увеличению продукции мРНК генов *groA* и *groB*, что свидетельствует об ингибирующем воздействии Dps на их экспрессию. Результаты оценки влияния Dps на экспрессию собственного гена, полученные с использованием qRT-PCR и репортёрной конструкции, наоборот, выявили снижение его экспрессии. Таким образом, полученные автором данные являются весомым аргументом в пользу участия Dps регуляторных процессах.

В заключении автор подводит основные итоги работы, обсуждает полученные результаты и делает предположения о необходимости расширения представлений о функциональной роли Dps в клетке. Концептуально значимым, например, может быть предположение автора о возможном участии Dps в структурно-специфическом разрушении нуклеиновых кислот. Основанием для этого послужили данные о наличии двухвалентного железа в составе неорганического ядра Dps, пространственная близость белковой поры, ведущей во внутреннюю полость Dps, к нуклеиновым кислотам, взаимодействующим с Dps и предпочтительный контакт с разветвленными структурами, которые могут формироваться и в ДНК и в РНК. Выводы диссертационной работы сформулированы четко, и в них отражены основные результаты диссертационной работы. Содержание автореферата и публикации по результатам работы полностью отражает основные положения диссертации.

По результатам, представленным в диссертационной работе, опубликовано относительно небольшое, но достаточное по правилам ВАК количество печатных работ. Их общее число в научных изданиях составляет 31, из них 11 публикаций сделаны в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий рекомендованных ВАК РФ, из которых 6 индексируются МБД Scopus и 6 в МБД Web of Science. Помимо этого, автором подано две патентные заявки на полезную модель.

Результаты диссертации следует использовать при разработке учебных курсов по молекулярной биологии, биофизики и биохимии в ВУЗах Российской Федерации. Помимо этого данные диссертационной работы и сформулированные рекомендации могут быть рекомендованы для использования в профильных научно-исследовательских центрах РАН. 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.

Выявленные недостатки и замечания

1. В диссертационной работе проведено экспериментальное определение констант связывания Dps с фрагментом регуляторной области гена *dps H*, который не содержит основного промотора, и искусственной, самособирающейся Y-подобной ДНК, в результате которого выявлено что их константы связывания существенно отличаются. При этом не приведено данных, об экспериментальном тестировании константы диссоциации фрагмента *S*, содержащего основной промотор, хотя такая оценка могла быть полезной.

2. На рис. 48 и 49 (пункт 3.14, с. 165 и далее) приведены распределения размеров частиц белка Dps при действии различных температур. Однако полученные данные более справедливо относить только к белковым компонентам нуклеопротеидного комплекса, имеющим глобулярную конформацию. Вопрос, были ли зарегистрированы кривые плавления растворов ДНК и нуклеопротеидных комплексов. Эти данные могли бы хорошо дополнить понимание механизмов стабилизации нуклеопротеидов.

3. В разделе диссертации (п. 38, Рис. 34) автор приводит данные об особенностях взаимодействия фрагментов ДНК в условиях конкуренции за белок. А в разделе 3.19, упоминает о возможности конкуренции Dps с другими белками бактериального нуклеоида, но не приводит экспериментальных данных, которые могли бы подтвердить или опровергнуть данное предположение и тем самым усилить значимость результатов, полученных автором.

Тем не менее, отмеченные недостатки и замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической ценности диссертационной работы Антипова С.С.

Заключение

Рассматриваемая диссертация Антипова Сергея Сергеевича «Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного микроокружения и комплексирования с ДНК» представляет собой законченную научно-квалификационную работу. Результаты этой работы расширяют понимание роли белка Dps в бактериальной клетке и механизмов их реализации.

Работа соответствует критериям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 28.08.2017), а ее автор, Антипов Сергей Сергеевич, заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук по специальности - 03.01.02 Биофизика.

Отзыв обсуждён и одобрен на семинаре лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации ИМБ РАН (протокол № 118 от 26 апреля 2018г.)

Заведующий лабораторией молекулярных механизмов биологической адаптации
ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН
Доктор биологических наук, профессор

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН

Тел.: +7(499) 135-94-74

e-mail: misha672011@yahoo.com

Евгеньев Михаил Борисович

27.04.2018

*Подпись Елены М.Б. одобряю
ученой степени ИМБ РАН
Добров А.А.
27.04.2018*

