

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Антипова Сергея Сергеевича «Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного микроокружения и комплексования с ДНК», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Вопросы, связанные с архитектурой генетического материала, то есть с трехмерной укладкой геномной ДНК в живой клетке, волнуют исследователей уже довольно долгое время. Основная порция внимания в этой области науки, как это часто бывает, досталась эукариотическим организмам. Нуклеосомы, гистоновые белки, фибриллы ДНК – все это уже много лет входит даже не только в курсы молекулярной биологии в вузах, но и в школьную программу по биологии. В последнее десятилетие совмещение классических подходов к исследованиям хроматина с высокопроизводительным секвенированием позволило разработать ряд революционных методов (3-C, 5-C, Hi-C и т.п.). С их использованием были получены интереснейшие результаты, существенно меняющие наши представления об укладке ДНК в ядре эукариотической клетки.

В то же время, скромные и незаметные прокариоты остались, как говорится, на обочине истории, и объем наших знаний о пространственной организации их ДНК и о белках, обеспечивающих такую организацию, гораздо меньше. Тем приятней мне было ознакомиться с диссертационной работой Сергея Сергеевича Антипова, которая до некоторой степени устраняет это досадное недоразумение, поскольку целиком посвящена белку Dps – одному из важнейших белков бактериального нуклеоида. Несмотря на то, что это белок в стационарной фазе роста бактерий присутствует в составе нуклеоида в количестве, превышающем таковые для любого другого белка, о механизмах его взаимодействий с ДНК, как и о том, для чего, собственно, эти взаимодействия нужны, практически ничего не было известно. Более того, белок Dps характеризуется еще и способностью накапливать токсичные для бактериальной клетки двухвалентные ионы железа и окислять их до трехвалентных. Крайне любопытно было бы попытаться разобраться в том, зачем белку нуклеоида требуется накапливать ионы железа (или же наоборот – зачем железосвязывающему ферритиноподобному белку необходимо связываться с ДНК). И даже если оставить этот вопрос в стороне, то уже один факт совмещения конкретным белком двух данных функций делает теоретически возможным его использование для трансмиссии магнитных импульсов на геномную ДНК бактерии, что открывает поистине безграничные возможности для применения белка Dps в технологиях будущего. Во всех данных аспектах работы белка Dps и попытался разобраться Сергей Сергеевич, где-то более успешно, где-то – менее, но в целом, безусловно, успешно.

Работа Сергея Сергеевича под названием «Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного микроокружения и

комплексирования с ДНК» (слова «комплексирование» в русском языке вообще-то нет, но это я так, к слову) построена по стандартному плану и содержит все разделы, традиционно ожидаемые в диссертации на соискание ученой степени доктора наук. Опустим анализ введения, которое вполне достойно выполняет свое предназначение, то есть вводит читателя в курс дела, и перейдем к разделу «Обзор литературы». Очевидно, что для его написания Сергей Сергеевич проделал громадную работу с научной литературой, которую практически безоговорочно следует признать успешной. Раздел содержит массу самой разносторонней информации о белке Dps и о смежных вопросах, то есть о структуре бактериального нуклеоида, о белках, входящих в его состав, о ферроксидазном центре белка Dps, о дополнительных функциях этого белка и, наконец, о перспективах его практического использования. Нужно отметить, что таких перспектив Сергей Сергеевич насчитал четыре штуки, и каждая соответствующая область биоинженерии описывается в обзоре литературы достаточно подробно и, не побоюсь этого слова, увлекательно. Серьезных сутевых вопросов к данному разделу работы у меня не имеется, зато имеется один не очень серьезный, но имеющий особое значение лично для меня. Дело в том, что я имею несчастье обладать так называемой врожденной грамотностью, в связи с чем чтение чужих текстов часто превращается для меня в пытку. Сергей Сергеевич внес посильный вклад в эту экзекуцию массой стилистических огрехов, которые вообще характерны для его работы, но наиболее сильно бросаются в глаза именно в обзоре литературы. Однако я подчеркиваю особо, что этот момент в каком-то смысле является моей личной проблемой, и никаких претензий к Сергею Сергеевичу в связи с этим я не имею. Отмечу только лишь отдельные неудачно использованные термины, например, «транскрипция промоторов», «на 70% гомологичны по аминокислотной последовательности» и т.п. Наконец, я так и не понял логики, которой Сергей Сергеевич руководствовался при назначении цитируемым работам номеров. Первый имеющийся в работе номер, отсылающий читателя к списку литературы – это номер 220. Затем цитирование продолжается по порядку до номера 240, а следующий номер ссылки – почему-то 17. В дальнейшем номера цитируемых работ следуют в настолько же эклектичном порядке. Завершая анализ обзора литературы, отмечу еще раз, что он произвел на меня очень хорошее впечатление, а те замечания, которые я высказываю, носят совершенно непринципиальный характер.

Раздел «Материалы и методы исследования» понравился мне еще больше, чем обзор литературы. Во-первых, только прочтя его, я в полной мере осознал, насколько междисциплинарный характер носит работа Сергея Сергеевича. А ведь междисциплинарность – это самое интересное, что есть в современной науке, именно на стыке дисциплин сегодня получают самые прорывные результаты. Во-вторых, раздел написан практически образцово для диссертации на соискание ученой степени доктора наук, то есть без излишних технических подробностей, но так, что у читателя складывается четкое

представление об объеме выполненной работы, а также о ее экспериментальной специфике.

Полагаю, что пора переходить к рассмотрению экспериментальных результатов работы Сергея Сергеевича. Здесь все начинается с того, что Сергей Сергеевич демонстрирует усиление экспрессии гена *dps* в ответ на воздействие электромагнитного излучения на клетки *E.coli*. Видимо, по замыслу автора, этот факт должен был стать некоей «затравкой» для читателя, чтобы возбудить его интерес, поскольку Сергей Сергеевич после этого утверждает, что теперь-то уж точно необходимо начинать изучение свойств белка Dps. На мой взгляд, его можно было начинать и без данного любопытного факта, а если учесть, что сама по себе связь экспрессии гена *dps* с электромагнитным излучением в работе никакого продолжения не получает, остается не совсем понятным, зачем данный эксперимент был вообще включен в работу.

Как бы то ни было, Сергей Сергеевич переходит к изучению физико-химических свойств белка Dps и убедительно демонстрирует, что этот белок в виде олигомера может содержать разное количество ионов железа разной валентности, что естественным образом подтолкнуло его к изучению вопроса о связи концентрации ионов железа с олигомеризацией белка. Действительно, оказалось, что ионы железа стабилизируют каноническую додекамерную форму белка Dps. При помощи молекулярного докинга Сергей Сергеевич показывает, что белок Dps должен предпочтительно связывать трехвалентное железо. Этот результат представляется мне достаточно странным, поскольку трехвалентное железо не является токсичным для бактериальной клетки, в отличие от двухвалентного. Исходя из этого, сродство Dps к двухвалентному железу должно быть выше, чтобы посредством его связывания во внутренней полости олигомера изолировать токсический компонент от внутриклеточного содержимого. Видимо, этот момент должен в очередной раз заставить всех задуматься о доверии результатам компьютерного анализа без их экспериментального подтверждения.

После этого Сергей Сергеевич начинает изучать комплексообразование белка Dps с различными фрагментами ДНК, которые по результатам компьютерного моделирования должны тем или иным образом изгибаться. Для анализа взаимодействия автор выбрал наиболее технически простой метод задержки в геле, который подразумевает появление в геле полосы, соответствующей ДНК-белковому комплексу, с подвижностью меньше, чем у свободного фрагмента ДНК. Именно по увеличению интенсивности такой полосы с увеличением концентрации белка в реакции судят об образовании комплекса. Однако же Сергей Сергеевич практически ни в одном случае не увидел такой полосы (см. рисунок 33), что ставит под сомнение интерпретацию полученных им результатов. В ряде случаев с увеличением концентрации белка происходило уменьшение интенсивности полосы свободной ДНК, однако этого недостаточно, чтобы судить о комплексообразовании. Более того, в случае фрагмента ДНК под названием *hns-2* поначалу с увеличением концентрации белка Dps уменьшения

интенсивности полосы свободной ДНК не происходило, но при максимальной концентрации белка она попросту пропала из геля. Таким образом, нужно признать, что метод задержки в геле для решения задачи, стоявшей перед Сергеем Сергеевичем, не подходит. Следовало воспользоваться альтернативными методами, позволяющими детектировать формирование ДНК-белкового комплекса, например, реакцией удлинения праймера или футпринтингом (что, собственно, Сергей Сергеевич и сделал для анализа взаимодействия Dps с промоторными участками его собственного гена). Спасает ситуацию то, что по результатам, полученным Сергеем Сергеевичем, он в любом случае не делает никаких выводов о специфичности Dps по отношению к тем или иным фрагментам ДНК, за исключением как раз промоторных областей собственного гена. Далее на основании этого результата через череду некоторых логических умозаключений Сергей Сергеевич делает предположение о том, что модуляторами связывания Dps с ДНК могут являться сахара. Проверку этого предположения он проводит методом задержки в геле и впервые замечает на геле полосу, соответствующую комплексу Dps с фрагментом промотора его гена. (Очень жаль, что Сергей Сергеевич не проверил в аналогичных экспериментах промоторные области генов, для которых известно, что их экспрессия зависит от Dps). Автор также подмечает влияние некоторых сахаров на олигомеризацию белка и на основании этого делает заключение, что сахара действительно могут являться модуляторами активности Dps. Мне, правда, осталось непонятным, как это может соотноситься с тем фактом, что в стационарной фазе роста, когда белка Dps в клетке больше всего, сахаров в питательной среде, наоборот, мало. Возможно, конечно, что Dps проявляет какую-то специфическую активность именно в логарифмической фазе роста культуры, когда сахаров в среде еще много, и они вполне могут модулировать именно эту активность белка.

После этого Сергей Сергеевич в серии изящных экспериментов, в которых участвовали искусственно собранные Y-подобные ДНК-структуры, а также плазмиды с одноцепочечными разрывами, демонстрирует, что Dps преимущественно связывается с ДНК либо в точках ветвления Y-образных структур (что может отражать его участие в регуляции транскрипции), либо с концами двойной спирали ДНК. Затем Сергей Сергеевич переходит к финальной части работы, а именно к поиску участков связывания белка Dps в геномной ДНК кишечной палочки в надежде подтвердить результаты экспериментов *in vitro* и обнаружить предпочтительное связывание Dps с разветвленными структурами (репликация, рекомбинация, транскрипция) и с концами двуцепочечной ДНК (репарация). Для этого был применен метод иммунопреципитации хроматина, совмещенный с высокопроизводительным секвенированием. Очевидно, напрямую решить данную задачу этим методом невозможно (или, по крайней мере, чрезвычайно трудно), поэтому Сергей Сергеевич возложил особые надежды на области генома, богатые повторяющимися последовательностями, в которых часто имеет место рекомбинация и репарация, а также на «промоторные островки», очевидным

образом связанные с транскрипцией. Автор показал, что распределение Dps по геному кишечной палочки носит неоднородный характер, и что участки его связывания обогащены инвертированными повторами и «промоторными островками». Это хорошо согласуется с его гипотезой. Также были идентифицированы некоторые консенсусные последовательности, которыми обогащены участки связывания Dps, и очень жаль, что Сергей Сергеевич не подтвердил данный результат экспериментами *in vitro*. Наконец, автор осуществил делецию гена *dps* в клетках *E.coli* и показал, что в отсутствие данного белка мРНК, кодирующей РНК-полимеразу, становится больше, а промотор гена *dps* начинает работать слабее. Здесь, на мой взгляд, было бы уместно осуществить полногеномный анализ экспрессии генов в штамме, не содержащем Dps, методом RNA-seq, однако я понимаю, что это не самая простая задача, требовать выполнения которой в обязательном порядке негуманно.

Завершая анализ работы Сергея Сергеевича, хочу отметить, что в ней было получено множество интереснейших новых данных о белке Dps и о механизмах его работы. Более того, были описаны некоторые общие закономерности, связанные с данным белком, как это и должно происходить в любой работе, представляемой на соискание ученой степени доктора наук. Но не менее ценным свойством работы Сергея Сергеевича мне представляется то, что она ставит перед нами очень много вопросов, которые еще только предстоит разрешить, и которые без этой работы поставлены быть не могли. Я считаю, что постановка новых вопросов – это не менее важное свойство научного труда, чем ответы на уже поставленные вопросы, а ведь в работе Сергея Сергеевича имеет место и то, и другое. Следовательно, я должен оценить ее уровень как очень высокий.

Таким образом, диссертация Антипова Сергея Сергеевича «Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного микроокружения и комплексования с ДНК» соответствует автореферату, опубликованные результаты полностью отражены в диссертации. Список публикаций включает 31 работу, из которых 11 публикаций в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий рекомендованных ВАК РФ, из которых большая часть индексируются МБД Scopus и Web of Science. Помимо этого подано 2 заявки на защиту объектов интеллектуальной собственности, и, насколько мне известно, как минимум по одной из них принято положительное решение Федеральной службой по интеллектуальной собственности РФ. Таким образом, диссертация Антипова С.С. 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. 9-14 «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».

Профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова», доктор биологических наук (научная специальность
03.01.03 – Молекулярная биология)

Каменский Петр Андреевич

10.05.2018г.

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова»

119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12

Телефон: 8 (495) 939-27-76

Адрес электронной почты: peter@protein.bio.msu.ru

Подпись П.А. Каменского заверяю

Декан биологического факультета МГУ,
академик



М.П.Кирпичников

10.05.2018г.