

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор  
государственного  
учреждения науки  
физической химии и электрохимии  
им. А.Н. Фрумкина Российской  
академии наук (ИФХЭ РАН)



Буряк А.К.

2016 г.

#### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Дадиновой Любови Александровны

**«Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании трехмерных структур бионанокompозитов на основе ДНК и ряда белков, участвующих в катаболизме *Escherichia coli* в стационарной фазе роста», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – «физика конденсированного состояния»**

Диссертационная работа Дадиновой Л.А. посвящена интересным и актуальным в научном плане и значимым с практической точки зрения структурным исследованиям биологических объектов. Во-первых, это исследование структуры бионанокompозитов на основе ДНК, применяемых в современных нанотехнологиях медицинского направления, и, во-вторых, детальное изучение структурных характеристик и поведения в растворе ряда белков, участвующих в катаболизме стационарной фазы роста клеток *Escherichia coli*. В качестве основного метода структурной нанодиагностики был выбран метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), роль которого неопределима как в стремительно развивающейся в последние годы структурной биологии, так и в исследовании различных наноматериалов, в том числе медицинского назначения.

Одной из передовых форм современных нанотехнологий является использование биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) с целью создания на их

основе функциональных нанобиоустройств (так называемых молекулярных машин), аналогичных существующим в природе. Даже отдельная изолированная живая клетка представляет собой очень сложную биологическую молекулярную машину, в которой основными участниками процессов являются нуклеиновые кислоты и белки с многообразием их функций и свойств. Карта одних только белковых взаимодействий даже для хорошо изученной *Escherichia coli*, которую зачастую рассматривают в качестве модельной системы, весьма обширна, и до конца не исследована. Поэтому актуальность и значимость поставленных в диссертационной работе Л.А.Дадиной задач по исследованию структуры таких важных элементов жизнедеятельности любых организмов, как ДНК и ферменты, участвующие в клеточном метаболизме, не вызывает сомнений. Следует сразу отметить, что данная работа имеет и медицинскую направленность, то есть информация, которая была получена диссертантом в процессе выполнения работы, может и должна служить, во-первых, для разработки целевых препаратов на основе квазикристаллических форм ДНК, исследованных в диссертации, и, во-вторых, для дальнейшего выяснения взаимосвязи структуры и функции жизненно важных ферментов. Последнее необходимо при разработке стратегии профилактики и терапии некоторых заболеваний, связанных с нарушением нормального метаболизма клеток.

В соответствии с поставленными задачами, первая часть диссертационной работы Л.А.Дадиной посвящена исследованию структуры пяти ферментов, участвующих в катаболизме стационарной фазы клеток *E.coli*. Этот период жизнедеятельности клетки характеризуется необходимостью противостоять стрессовым эффектам, вызванным недостатком питательных веществ, при этом клетки становятся существенно более устойчивыми к воздействию антибактериальных препаратов. Определение структурных особенностей отдельных белков, участвующих в обмене веществ, а также выяснение механизмов регуляции метаболических процессов, является важным для понимания природы различных взаимодействий в клетках и их ответа на стресс.

Вторая часть работы связана с возможностью использования молекул ДНК в качестве строительных блоков при наноконструировании. Диссертантом исследовались холестерические жидкокристаллические дисперсии (ХЖКД) ДНК и их комплексы с наночастицами золота разного размера, на основе которых можно создавать наноматериалы, обладающие биосовместимостью и биodeградируемостью, необходимой для их применения в качестве носителей для направленной доставки лекарственных препаратов.

Биологическая природа исследуемых объектов определила выбор основного метода исследования - малоугловое рентгеновское рассеяние, поскольку именно этот метод

позволяет проводить структурные исследования в условиях, максимально приближенных к физиологическим. Несомненным преимуществом МУРР является также возможность получения формы низкого разрешения исследуемого объекта без наличия априорной информации о нем. Современные подходы к интерпретации данных позволяют сочетать метод МУРР с другими структурными методами (рентгеновская кристаллография, ядерно-магнитный резонанс, биоинформатические методы и т.д.), что позволяет получать наиболее полную и достоверную информацию об объекте.

Научная новизна работы состоит, в первую очередь, в получении моделей низкого и атомного разрешения четвертичной структуры ранее неисследованного белка фруктозо-1,6-бисфосфат альдозазы (FbaB). Во-вторых, для белков с известной кристаллографической структурой (неорганическая пирофосфатаза (PPase), 5-кето-4-дезоксисурилат изомераза (Kdul), глутамат декарбоксилаза (GadA), дегидролипиддегидрогеназа (LpD)) было проведено сравнение со структурой в растворе и выявлены различия. Показано, что некоторые белки в растворе представляют собой олигомерные смеси своих форм. Полученные результаты депонированы в белковую базу данных малоуглового рассеяния (SASBDB). В-третьих, определены структурные характеристики холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) ДНК при различной концентрации полиэтиленгликоля в растворе и показаны происходящие структурные изменения. Выявлены и проанализированы эффекты, вызываемые инкорпорацией золота.

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, описания основных результатов и выводов и списка цитируемой литературы. Во введении содержится обоснование актуальности проводимых исследований, излагаются цели и задачи диссертационной работы, отмечены ее новизна и научно-практическая значимость, а также сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе проведен краткий экскурс в историю развития метода малоуглового рассеяния. Автором рассмотрены особенности эксперимента по малоугловому рассеянию на лабораторном и синхротронном источниках и теоретического описания монодисперсных, многокомпонентных и частично упорядоченных систем, которые были исследованы в настоящей работе. Особенно стоит выделить широкий и подробный обзор методов и подходов к интерпретации данных, благодаря которым читатель может без труда понять в дальнейшем, каким образом были получены модели трехмерных структур по кривой малоуглового рассеяния. В целом глава отражает высочайший уровень современных подходов к обработке данных и возможностей малоуглового рассеяния.

Во второй главе приведен краткий, но дающий необходимое представление о структуре и функциях белков, литературный обзор, при этом более подробно рассмотрены функции белков-ферментов. Здесь автор акцентирует свое внимание на необходимости исследования общих структурных характеристик и механизмов регуляции отдельных белков, участвующих в обмене веществ стационарной фазы роста клеток, поскольку эти знания являются ключевыми для понимания сложности процессов регуляции клеточного метаболизма и стрессовых реакций.

Глава 3 посвящена описанию результатов структурных исследований пяти ферментов, участвующих в катаболизме *Escherichia coli* в стационарной фазе роста (фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза, неорганическая пирофосфатаза, 5-кето-4-дозоксиуронат изомеразы, глутамат декарбоксилаза, дигидролипоилдегидрогеназа). В этой главе Л.А. Дадинова продемонстрировала высокий уровень владения всеми описанными в главе 1 современными методиками МУРР.

Особенно стоит отметить результаты моделирования структуры белка фруктозо-1,6-бисфосфат альдолазы, для которого полностью отсутствовали какие-либо структурные данные. Для определения третичной структуры протомера этого белка автором успешно применены биоинформатические методы, результаты которых были использованы для моделирования четвертичной структуры методами МУРР. Результатом сочетания разных методик стала модель, которая хорошо согласуется с экспериментальными данными. Кроме того, достоверность полученных с помощью МУРР результатов определения структурных характеристик и поведения белков в растворе проверялась с помощью дополнительных независимых методов, таких как молекулярный докинг, аналитическое ультрацентрифугирование и эксклюзионная хроматография. Все результаты находятся в согласии.

В главе 4 дан аналитический обзор литературы по способам формирования как самих холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) ДНК, так и наноконструкций на основе ХЖКД ДНК с гостевыми включениями, в том числе наночастицами золота. Проведенный Дадиновой Л.А. анализ литературы показал актуальность и необходимость дальнейшего исследования условий формирования и структуры ХЖКД ДНК, а также особенностей их взаимодействия с наночастицами золота разного размера, что и определило постановку задачи для исследований, проведенных в настоящей диссертационной работе.

В главе 5 представлены экспериментальные кривые рассеяния от структур ХЖКД ДНК, сформированных при различной концентрации ПЭГ в растворе, которые отражают изменение межплоскостного расстояния и размера упорядоченных областей. Автором

были построены модели, рассеяние от которых соответствует экспериментальным данным, наглядно демонстрирующие происходящие изменения. Исходя из этих данных, определена наиболее оптимальная концентрация ПЭГ, при которой происходит формирование структуры ХЖКД ДНК, наиболее пригодной для инкорпорирования различных гостевых молекул. На основе структурных характеристик образцов, полученных при анализе данных МУРР, с инкорпорированными наночастицами золота размером 2 и 15 нм, была проанализирована зависимость изменения количества упорядоченных областей от концентрации наночастиц золота. В дополнении к основному методу исследования использовался круговой дихроизм, по данным которого проводилась оценка степени упорядочения структуры ХЖКД ДНК. Стоит отметить, что по результатам данной работы автором была выдвинута гипотеза об аналогичности взаимодействия молекул ДНК в составе хромосом с наночастицами золота. Этот вывод может иметь важное практическое значение при исследовании генотоксичности наночастиц.

В заключении кратко сформулированы основные результаты проведенных исследований и выводы на их основе.

Научно-практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнений. Проведенные исследования структурных особенностей ферментов в растворе (фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза (FbaB), неорганическая пирофосфатаза (PPase), 5-кето-4-дозоксиуронат изомеразы (KduI), глутамат декарбоксилаза (GadA) и дигидролипиддегидрогеназа (LpD)) имеют как фундаментальное значение, так и практический интерес. Одной из важнейших проблем современной медицины является поиск новых антибиотиков, способных на время преодолеть проблему устойчивости бактерий к ним. Изучение клеточных механизмов, приводящих к резистентности, может помочь решить эту задачу. В стационарной фазе при адаптации клетки к стрессу происходит замедление метаболических процессов и значительно увеличивается устойчивость бактерий к воздействию антибактериальных препаратов. Поэтому проведенные Дадиновой Л.А. исследования ферментов, участвующих в катаболизме клетки *E.coli* стационарной фазы роста, могут внести понимание в общую систему регуляции метаболических процессов в этот период.

ХЖКД ДНК могут быть использованы в качестве матрицы для инкорпорирования наночастиц золота, при этом происходит формирование нанобиоматериала, который может стать основой для создания противоракового препарата. При этом вопрос о генотоксичности наночастиц остается открытым. И в данной работе важным выводом является гипотеза о том, что наблюдаемые изменения, происходящие в структуре ХЖКД ДНК при взаимодействии с наночастицами, могут происходить также и во взаимном

расположении макромолекул ДНК в хромосомах при взаимодействии с наночастицами, вызывая генотоксический эффект.

По диссертации Дадиновой Л.А. можно сделать следующие замечания:

1. При описании алгоритмов программ автор использует англоязычные термины, что усложняет восприятие текста.

2. В главе 3 говорится про возможное изменение каталитической активности белков, однако экспериментальных данных не приводится.

3. В главе 5 при описании взаимодействия наночастиц с молекулами ДНК в составе частиц дисперсий не уточняется, какой именно тип взаимодействий здесь может быть.

Отмеченные недостатки не снижают высокой ценности работы и не затрагивают основные выводы, поэтому не влияют на ее общую положительную оценку.

Материал диссертации изложен четко и последовательно. Наглядные рисунки, графики и таблицы хорошо иллюстрируют полученные автором результаты. Поскольку диссертация состоит из нескольких частей и получено множество результатов, заключения, сделанные в конце каждой главы, способствуют лучшему восприятию материала диссертации. Личный вклад автора в диссертационную работу не вызывает сомнений. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Диссертация представляет собой цельную, завершенную научно-исследовательскую работу по актуальной тематике и имеет практическую значимость.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 16 публикациях, из которых 6 статей в научных журналах, входящих в перечень рекомендованных ВАК, и апробированы на конкурсах, школах, симпозиумах и конференциях.

Диссертационная работа Дадиновой Л.А. может быть отнесена к научно-квалификационной работе, в которой содержится решение актуальной задачи, которая играет важную роль, как для фундаментальной науки о живом, практических аспектах применения полученных результатов, так и с методической точки зрения возможности использования метода малоуглового рассеяния.

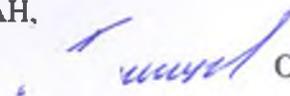
Рассматриваемая диссертационная работа является законченным исследованием и полностью соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным согласно п. 8 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, а ее автор, Дадинова Любовь Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – физика конденсированного состояния.

Диссертационная работа Дадиновой Л.А. «Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании трехмерных структур бионанокompозитов на основе ДНК и ряда белков, участвующих в катаболизме *Escherichia coli* в стационарной фазе роста», заслушана и обсуждена на расширенном заседании семинара лаборатории биоэлектрохимии, протокол № 3 от 25 августа 2016 года.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании семинара лаборатории № 3 от 25 августа 2016 года.

Отзыв составил:

Заведующий лабораторией биоэлектрохимии ИФХЭ РАН,  
кандидат физико-математических наук, доцент

 О.В. Батищев

119071, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 5

Телефон: 8(495) 9554751

Электронная почта: olegbati@mail.ru