

Отзыв официального оппонента на диссертацию
Любови Александровны Дадиновой
**«Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании трехмерных структур
бионаноккомпозитов на основе ДНК и ряда белков, участвующих в катаболизме *Escherichia
coli* в стационарной фазе роста»,**
представленной на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по
специальности 01.04.07 – «Физика конденсированного состояния»
в диссертационный совет Д 002.114.01

Диссертация Л.А. Дадиновой посвящена изучению структуры и функций биологических макромолекул, которые, по своей природе, обладают способностью к образованию сложных многоуровневых пространственных структур, формирующихся как на молекулярном, так и на надмолекулярном уровнях. Подробное изучение особенностей формирования таких структур открывает широкие перспективы их направленного регулирования, что имеет важнейшее значение для тех направлений развития нанотехнологий, в которых используются биологические молекулы, например - создание нанобиоустройств (молекулярных машин) и биосовместимых наноматериалов для практического использования в медицине и биотехнологии.

В этой связи, актуальность и практическая значимость диссертационной работы Л.А. Дадиновой не вызывают никаких сомнений.

В диссертации Л.А. Дадиновой исследованы пять белков, участвующих в катаболизме стационарной фазы роста клеток *Escherichia coli*. Исследование особенностей функционирования клетки в стационарной фазе представляет несомненный интерес с практической и фундаментальной научной точек зрения, поскольку это позволяет определить механизмы регуляции метаболических процессов в клетках и их ответа на изменения условий окружающей среды.

Помимо этого, в работе исследована также структура комплексов холестерических жидкокристаллических дисперсий ДНК с инкорпорированными наночастицами золота разного размера, что имеет важное значение для развития научных основ конструирования на основе нуклеиновых кислот разнообразных "строительных блоков" для создания биосовместимых наноматериалов медицинского назначения.

Таким образом, выбор объектов исследования для достижения цели и решения задач диссертационной работы можно признать вполне обоснованным.

Основным экспериментальным методом, использованным в данной работе, являлся метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), который позволяет изучать структуру биологических объектов в условиях, максимально приближенных к физиологическим, что

особенно важно для медицинских и биологических применений. Для того, чтобы уменьшить неоднозначность интерпретации данных МУРР, в диссертационной работе Л.А. Дадиновой использовали другие независимые структурные методы и методы моделирования, такие как аналитическое ультрацентрифугирование и молекулярный докинг.

Очевидно, что выбранные автором работы экспериментальные методы исследования своих объектов являются информативными и полностью адекватны целям и задачам исследования.

Диссертация Л.А. Дадиновой состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Общий объем диссертации составляет 139 страниц, включая 42 рисунка и 7 таблиц.

Глава 1, относительно небольшая по объему, посвящена аналитическому обзору метода МУРР, включая краткое описание истории его развития, теоретическим аспектам применения МУРР для монодисперсных, многокомпонентных и частично упорядоченных систем, а также постановке эксперимента и современным подходам к интерпретации данных, в основном - с использованием программного комплекса ATSAS.

В целом, в ней кратко рассмотрены все основные вопросы, относящиеся к выполнению исследований по теме диссертации.

По материалам первой главы можно сделать несколько замечаний.

1. Стр. 17. *"...Поскольку уравнение (6) представляет собой бесконечный интеграл, измеренная интенсивность может быть экстраполирована в нулевой угол и к бесконечности..."*

Уравнение не может представлять собой интеграл, а бесконечный интеграл - это что-то новое.

Интенсивность, в этом контексте, не "может", а "должна быть" экстраполирована.

2. Стр. 19. *"...на картине рассеяния в малоугловой области могут появляться дифракционные максимумы, соответствующие отражениям от атомных плоскостей..."*

В малоугловой области отражения от атомных плоскостей отсутствуют, присутствуют отражения от так называемых "больших периодов" (в англоязычной научной литературе - long period).

3. Там же. *"...Поскольку интенсивность малоуглового рассеяния $I(s)$ пропорциональна числу фотонов, рассеянных в направлении s (тчк)..."*

Предложение оборвано. Кроме того, если говорить о направлении рассеяния, то нужно указывать вектор рассеяния \vec{s} , а не скалярную величину модуля вектора рассеяния s .

4. Стр. 22. *"...Также рентгеновские трубки различаются по размеру фокусного пятна и по величине светящейся поверхности анода. Размеры фокусного пятна определяют геометрию*

коллимационных систем и могут варьироваться от 10 до 10-20 мм..."

Для коллимационных систем, в действительности, важен размер проекции фокусного пятна рентгеновской трубки (острый фокус, широкий фокус), а не сам размер пятна.

5. Стр. 23. *"...Источники синхротронного излучения установлены на кольцевых ускорителях, где медленно, экспоненциально убывает ток..."*

Общепринято считать, что начальное экспоненциальное убывание в линейной шкале времени - это быстрый, а не медленный процесс. Асимптотическое экспоненциальное убывание - медленный процесс. Что здесь хотел сказать автор - остается неясным.

Глава 2 диссертационной работы Л.А. Дадиновой, как и глава 1, также представляет собой краткий литературный обзор, посвященный общим сведениям о структуре и функциях белков, в частности ферментов, которые участвуют в регуляции катаболизма *Escherichia coli* в стационарной фазе роста (фруктозо-1,6- бисфосфат альдолаза, неорганическая пирофосфатаза, 5-кето-4-дозоксиуронат изомеразы, глутамат декарбоксилаза, дигидролипоилдегидрогеназа).

Анализ современного состояния проблемы позволил автору диссертационной работы сформулировать постановку основных задач исследования, решению которых посвящена следующая глава диссертационной работы.

Глава 3 посвящена описанию деталей эксперимента по МУРР, дополнительным методам исследования, а также результатам исследования пяти ферментов участвующих в катаболизме *E. coli* в стационарной фазе роста.

Здесь, с помощью метода малоуглового рассеяния и компьютерного моделирования были определены третичная и четвертичная структуры фруктозо-1,6- бисфосфат альдолазы (FbaV) класса I из *E.coli*.

Была получена модель гексамера неорганической пирофосфатазы (PPase) и выявлены конформационные отличия этого белка в растворе и в кристалле.

Из данных МУРР, совместно с аналитическим ультрацентрифугированием и эксклюзионной хроматографией белка 5-кето-4- дезоксиуронат изомеразы (KduI), было показано, что фермент олигомеризуется в растворе, образуя равновесную смесь гексамеров, димеров и двух типов додекамеров.

С использованием этих же методов было показано, что гексамер глутамат декарбоксилазы (GadA) в растворе при pH 7.5 частично диссоциирует на димеры с образованием гетерогенной смеси, где форма гексамеров и димеров, а также их доля в растворе зависит от ионной силы.

Методами МУРР, молекулярного докинга и аналитического ультрацентрифугирования продемонстрировано, что дигидролипоилдегидрогеназа (LpD) в растворе образует равновесную

смесь димеров и тетрамеров.

В целом, в данной главе получены исключительно ценные для дальнейших исследований надежные результаты, которые, по сути, являются основными результатами диссертационной работы.

Необходимо отметить, что небольшой объем изложения конечных результатов не отражает весь огромный объем стоящей за этим выполненной автором диссертации препаративной, экспериментальной и вычислительной работы, которую по достоинству могут оценить специалисты, работающие в области МУРР, включающей: формулировку задач исследования, разработку плана эксперимента, препарирование образцов, проведение эксперимента, анализ данных, проведение вычислительного эксперимента и моделирование, обобщение результатов.

Материалы главы 3 диссертационной работы Л.А. Дадиновой заслуживают, по мнению рецензента, самой высокой оценки.

В главе 4 анализируются литературные данные по способам получения жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) ДНК, пространственной организации молекул двухцепочечной ДНК в частицах дисперсий и способах формирования надмолекулярных сборок на основе ХЖКД ДНК в условиях водно-солевого раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) с гостевыми включениями.

Глава 5 посвящена результатам исследований пространственной структуры ХЖКД ДНК, сформированной при различной концентрации ПЭГ, а также сравнению эффективности взаимодействия наночастиц золота с ХЖКД ДНК в зависимости от размера наночастиц.

Для исследования пространственной структуры и способа упаковки молекул ДНК в частицах ХЖКД в зависимости от концентрации ПЭГ в растворе была получена серия кривых малоуглового рассеяния от образцов ХЖКД ДНК с различным содержанием ПЭГ.

На основе реальной структуры ДНК В-формы, взятой из банка данных RCSB Protein Data Bank (PDB: 1BNA), с помощью программы MASSHA были построены две модели отражающие структуры ХЖКД ДНК, сформированные при крайних концентрациях ПЭГ в растворе – 170 и 300 мг/мл, и рассчитаны соответствующие модельные кривые рассеяния.

Сопоставление результатов эксперимента по малоугловому рассеянию и численного моделирования позволило объяснить изменение пространственной структуры и способа упаковки молекул ДНК в частицах ХЖКД в зависимости от концентрации ПЭГ в растворе и количественно описать происходящие процессы.

С целью сравнения эффективности взаимодействия наночастиц разного размера с ХЖКД ДНК методом МУРР была исследована серия образцов ХЖКД ДНК с инкорпорированными

наночастицами золота размером 2 и 15 нм при разных концентрациях.

Было показано, что золотые наночастицы размером 15 нм в 10 раз более активно взаимодействуют с макромолекулами ДНК по сравнению с наночастицами золота размером 2 нм, что позволяет последним встраиваться между слоями ДНК, образуя упорядоченные кластеры.

В целом материал главы 5 представляет собой материал отдельного небольшого, но изящно выполненного исследования, которое имеет ряд интересных следствий гипотетического характера относительно аналогичных изменений структуры во взаимном расположении макромолекул ДНК в хромосомах, вызывающих генотоксический эффект.

По материалам главы 5 представляется необходимым сделать несколько замечаний.

1. Стр. 100. *"...Можно заметить, что при увеличении концентрации ПЭГ пики становятся более узкими, а их положение смещается с 1.9 до 2.4 нм⁻¹, что свидетельствует о повышении степени упорядоченности структуры..."*

Более узкие пики действительно свидетельствуют об этом, а вот смещение пиков - нет.

2. Стр. 101. *"...Она отражена в уменьшении степени разупорядоченности систем (Δ/d), а также увеличения размеров кристаллитов (L) с ростом концентрации ПЭГ в растворе..."*

В малоугловом рассеянии не принято использовать термин "кристаллит", поскольку это подразумевает наличие кристаллической решетки как таковой, чего в плохо упорядоченных системах просто нет. Вместо этого можно рекомендовать использование для этого параметра термины "размер области упорядочения" (long range order) или "радиус взаимодействия" (interaction radius), как это обозначено в описании программы PEAK, которую автор использовала для обработки своих данных.

3. Стр. 102-103. *"...Несмотря на то, что структура дисперсий в ПЭГ-содержащих растворах является фиксированной, некоторые степени свободы молекул ДНК за счет диффузии сохраняются, что и определяет "жидкостной" характер упаковки..."*

Как следует из данных на стр. 101 диссертации, значения параметра разупорядочения (Δ/d) для исследованных систем лежат в интервале 0.07-0.12. Согласно теории (см. монографию Б.К. Вайнштейна "Дифракция рентгеновых лучей на цепных молекулах", стр. 212), это интервал "кристаллического", а не "жидкостного" характера упаковки.

Рецензент отмечает, что выводы диссертации отражают поставленные задачи и соответствуют содержанию работы и тематике публикаций. Автореферат отвечает структуре диссертации и дает полное представление об основных научных и практических результатах, новизне и актуальности выполненной работы. Выносимые на защиту положения полностью подтверждены результатами и не вызывают сомнения.

В целом, диссертационная работа Л.А. Дадиновой интересна с научной точки зрения, актуальна, содержит данные, которые, несомненно, имеют большое научное и практическое значение. Диссертация написана хорошим профессиональным языком и должным образом оформлена. Рисунки хорошо иллюстрируют представляемый материал.

Замечания рецензента являются замечаниями редакционного характера и не влияют на высокую оценку самой диссертационной работы Л.А. Дадиновой.

На основании выполненного анализа содержания диссертационной работы Л.А. Дадиной можно сделать вывод, что представленная диссертационная работа удовлетворяет всем требованиям Постановления правительства Российской Федерации о порядке присуждения ученых степеней от 24 сентября 2013 года N 842, предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор, Любовь Александровна Дадинова, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – «Физика конденсированного состояния».

Официальный оппонент:

чл.-корр. РАН, доктор химических наук,
заведующий лабораторией структуры полимерных материалов
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Института синтетических полимерных материалов
им. Н.С. Ениколопова

Российской академии наук (ИСПМ РАН)

15 сентября 2016 года

Озерин Александр Никифорович

117393, Российская Федерация, Москва,

ул. Профсоюзная, 70

Тел. +7 (495) 332-58-28, 335-91-00

E-mail: ozerin@ispm.ru

Подпись Озерина Александра Никифоровича удостоверяю.

Начальник отдела кадров

ИСПМ РАН, к.х.н.



М.А.Бешенко