

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБК РАН



чл.-корр. РАН, проф.

Е. Е. Фесенко

21 октября 2016г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **ВОЛОХ ОЛЕСИ ИГОРЕВНЫ «Исследование взаимодействий ДНК с лигандами методами компьютерного моделирования и электронной микроскопии»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.01.02 – «Биофизика»**

Диссертационная работа Волох Олеси Игоревны посвящена исследованию структур ДНК в составе нуклеосом в присутствии РНК-полимеразы в процессе элонгации, как в норме, так и при разорванной обратной цепи ДНК, методами электронной микроскопии и компьютерного моделирования.

### **ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ ДЛЯ РАЗВИТИЯ БИОФИЗИКИ И АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ РАБОТЫ**

определяется тем, что в эукариотах транскрипция происходит при сохранении частичной целостности нуклеосом. В частности, регуляция эукариотической транскрипции обеспечивается изменениями в нуклеосомной упаковке ДНК, а нарушения транскрипции на нуклеосомах лежат в основе многих патологических процессов. Соответственно, понимание транскрипции на нуклеосомах необходимо для дальнейшего развития биофизики, а работы, освещающие ее структурные аспекты, крайне актуальны как собственно в биофизике, так и, более широко, в работах биомедицинской направленности.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ**

Поскольку транскрипция нуклеосомной ДНК, в том числе образование интермедиатов данного процесса, при ключевом для биофизики и биомедицины значении этой проблемы, является малоизученной областью этих наук, такие работы по определению характеризуются новизной. В особенности это касается биофизических аспектов данных процессов, поскольку практически единственным методом структурных исследований транскрипции нуклеосомной ДНК является электронная микроскопия. В частности, в рамках данной работы с помощью метода электронной микроскопии впервые получены трехмерные структуры элонгационных комплексов РНК-полимеразы (РНКП) *E. coli*, остановленных в положениях (+24) и (+42) в ходе транскрипции нуклеосомной ДНК; впервые исследовано влияние введения одонитевого разрыва в нематричную цепь ДНК на трехмерную структуру элонгационного комплекса. С помощью компьютерного моделирования построены модели возможных трехмерных структур данных комплексов. Методом молекулярной динамики оценено влияние введения одонитевого разрыва на механические свойства ДНК: показано уменьшение жесткости в структуре с одонитевым разрывом по сравнению с нормальной структурой ДНК.

Практическая значимость работы определяется влиянием нуклеосом и их взаимодействий с НК-полимеразой на транскрипцию в эукариотах, что является структурной основой регуляции транскрипции ДНК нуклеосомой и возникающих при нарушении этой регуляции патологий.

### **ДОСТОВЕРНОСТЬ НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДОВ РАБОТЫ**

Достоверность научных результатов и выводов работы можно считать практически гарантированной – используются, для каждого из задействованных методов, наиболее передовые подходы. Это касается как непосредственного получения данных, так и их обработки.

В отношении метода электронной микроскопии это подтверждается использованием нескольких существенно отличающихся по своей физико-химической сущности разновидностей метода и сопоставлении полученных данных, что дало практически идентичные результаты.

В отношении метода молекулярной динамики, хотя соответствующий раздел и назван диссертантом скромно «апробацией», речь фактически идет о контрольном исследовании, подтверждающем адекватность метода молекулярной динамики (МД) для анализа жесткости ДНК. Так что и в этом случае достоверность результатов и выводов сомнению не подлежит.

### **РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДОВ РАБОТЫ**

Результаты и выводы диссертации, а конкретно касающиеся механизмов взаимодействия РНК полимераз с нуклеосомами, могут быть использованы в тех учреждениях, где используется или изучается транскрипция нуклеосомной ДНК, а именно в Институте Молекулярной Биологии РАН, Институте Биоорганической химии РАН, Институте Биомедицинской химии РАН, Институте Молекулярной Генетики РАН и др.

### **СТРУКТУРА И АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ**

Диссертационная работа Волох О.И. состоит из введения, четырех глав, выводов, благодарностей, списка цитируемой литературы, включающего 213 наименований, и двух приложений. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста и включает 52 рисунка и 8 таблиц. Результаты работы неоднократно докладывались на отечественных и зарубежных конференциях, а также отражены в научных публикациях автора.

### **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** сформулированы цели и задачи работы, обоснована ее актуальность и научная новизна.

В **первой главе** (литературном обзоре) кратко разобраны физико-химические, структурные и функциональные особенности ДНК, хроматина и РНК-полимераз. Более подробно рассмотрены механизмы и особенности транскрипции свободной и нуклеосомной ДНК, а так же факторы, способные приводить к остановке транскрипции. Особое внимание уделено структуре хроматина, причем в соответствующий раздел включены и сведения об РНК-полимеразах, как эукариотической РНКПШ, так и бактериальной РНКП, использованной в работе вместо РНКПШ (с кратким обоснованием этой замены). Весьма подробно описаны основы методов просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), трехмерной реконструкции и компьютерного моделирования в электронной микроскопии и молекулярной динамики (МД).

**Вторая глава** (материалы и методы) описывает этапы экспериментальной работы: подготовку образцов и сеток для ПЭМ-исследований, процедуру проведения исследований методами ПЭМ негативного контрастирования и крио-ПЭМ. Последовательно разобраны этапы получения и обработки данных и проведение трехмерной реконструкции элонгационных комплексов. Обращает на себя внимание краткость методической главы – она содержит лишь семь страниц.

В третьей главе описаны результаты исследований, включающие результаты ПЭМ негативного контрастирования и крио-ПЭМ элонгационного комплекса, остановленного в положении (+42) нуклеотид позиционирующей последовательности (НПП). Описаны и результаты ПЭМ негативного контрастирования нормального элонгационного комплекса, остановленного в положении 24 - ЭК(+24), а так же ЭК(+24) с введенным одонитевым разрывом в (+12) положении НПП. Кроме того, описана методика исследования по механическим особенностям модели фрагмента ДНК в норме и с введенным одонитевым разрывом. Приводятся и предварительные результаты проведенных исследований механических свойств ДНК.

В четвертой главе производится обсуждение полученных результатов. В главе высказано обоснованное предположение, что при «отскоке» РНК-полимеразы от нуклеосомного барьера, не происходит, как считалось ранее, диссоциация высвобожденного фрагмента ДНК от нуклеосомы, а вместо этого происходит его обратное закручивание на нуклеосому. В диссертации проводится также анализ данных футпринтинга ДНКазой I, показывающие, что узнаваемая этим ферментом область поверхности ДНК недоступна ему ни в нуклеосоме, ни в элонгационном комплексе. В этой части работы обсуждается стабилизация димера гистонов H2A/H2B витком спирали ДНК в модели ЭК, остановленного в положении +42. Несмотря на то, что димер H2A/H2B обращен во внешнюю среду, он остается ассоциированным с октамером.

Сравнительное изучение структур ЭК(+24) в норме и с одонитевым разрывом позволило сформулировать весьма правдоподобный механизм остановки транскрипции при одонитевом разрыве через обратное замыкание петли ДНК на нуклеосому и соответственно блокировку РНК-полимеразы внутри этой петли. Указанное обратное замыкание становится возможным за счет снижения жесткости ДНК в результате одонитевого разрыва, что показано средствами молекулярной динамики.

Диссертация снабжена также двумя приложениями. В первом описана апробация метода молекулярной динамики для исследования влияния взаимодействий ДНК с лигандами на жесткость ДНК, а во втором приводятся нуклеотидные последовательности использованных в работе плазмид.

В выводах обозначены основные результаты работы, соответствующие поставленным целям и задачам диссертации.

### **ВОПРОСЫ И ЗАМЕЧАНИЯ, ВОЗНИКШИЕ ПРИ ЧТЕНИИ ДИССЕРТАЦИИ**

Главный недостаток работы – часто встречающиеся неточности в формулировках, иногда приводящие к затруднению восприятия текста или даже искажающие его смысл. Кроме того, в работе имеются неточности при использовании ссылок и оформлении рисунков, печати. Ниже приведены примеры всех четырех типов указанных недочетов.

#### **Неточности в формулировках**

Стр.4 Название раздела «Апробация метода молекулярной динамики для исследования взаимодействий ДНК с лигандами» не вполне удачно, так как взаимодействие ДНК с лигандами-интеркляторами неоднократно и успешно изучалось методом МД, а в данном случае речь идет о влиянии связывания лигандов на жесткость ДНК.

Стр.9 «Регуляция транскрипции обеспечивается постоянными взаимодействиями ... факторами ремоделирования хроматина.» Транскрипция действительно регулируется ремоделированием хроматина, например, через связывание или отщепление факторов транскрипции. Но сами факторы транскрипции не обязательно являются факторами ремоделирования хроматина. На той же странице список в разделе «Природа взаимодействий ДНК с молекулами-лигандами» содержит содержательную неоднородность, затрудняющую восприятие. А именно, первые два пункта описывают физико-химические аспекты указанных сил, а последние

два – биологически-функциональные. Было бы желательно унифицировать содержание указанного списка.

Стр.11 Раздел 1.2 «Структура хроматина» назван неточно, так как в нем скорее обсуждаются аспекты его функции, причём связанные с функционированием РНК-полимеразы.

Стр.18. «Образование  $\Phi$ -петли [нулевой петли] сопровождается вытеснением участка  $\geq 50$

п.н., дистального по отношению к промотору конца ДНК нуклеосомы». Смысл потерян. Вероятно, имелось в виду «к промоторному концу»?

Стр.36. Определение «коррекции ЧКХ» (частотно-контрастная характеристика) страдает неточностью формулировки. По смыслу речь идет о коррекции изображения делением сигнала на ЧКХ в обратном пространстве, а не коррекции самой ЧКХ. Далее, когда говорится об устранении нулей ЧКХ, на которые делится сигнал, неспециалисту не очевиден предлагаемый способ – манипуляции с дефокусом. Вопрос требует, на мой взгляд, более подробного обсуждения.

Стр.37,38 «Приемлемым подходом является установка среднего значения электронной плотности изображений всех частиц на одном уровне (обычно нулевом)». Неясно. Может быть, принятого за нулевой?

Стр.45 и далее «репроекция» термин интуитивно ясен, но следовало бы определить его

Стр.64. методическая часть МД расчетов изложена здесь слишком кратко. Гораздо подробнее методики МД изложены в главе 3.

Стр.76. «Расчет параметров подвижности... производился с использованием программы ХЗ DNA». Речь идет о чисто геометрических параметрах Дикерсона. Подвижность они характеризуют, если следить за ними в ходе МД-траекторий.

Стр.91 «В структуре ЭК(+24) без разрыва отсутствует участок электронной плотности, соответствующий ДНК (рисунок 37 А, Б)». Не указано, какой именно участок отсутствует. Наверно, тот, о котором шла речь в предыдущем предложении? Далее, «Для интерпретации полученных структур...» Наверно, интерпретация карт электронной плотности? Структуры – это ведь уже результат интерпретации?

#### Использование ссылок

Раздел «1.1 Физико-химические и структурные особенности ДНК» не содержит ссылок в большей части подразделов или, что еще хуже, содержит научно-популярную ссылку из Соросовского Образовательного Журнала (СОЖ) с материалом недостаточного для цитирования в диссертации качества (эта ссылка, кстати, оформлена неправильно - работа относится не к 1988, а к 1998г.) ; Стр.22. Раздел «Остановка транскрипции молекулами-лигандами ДНК» не содержит ссылок; Стр.33. Рисунок 9. Ссылка [Elsevier Inc. 1998] в списке литературы не обнаружена; Стр.41 van Heel&Frank, 1981 ссылка в списке литературы не обнаружена; Стр.42 «Мультиреференсное выравнивание изображений» – подраздел не содержит ссылок.

#### Оформление рисунков

На рис.19 не пояснен смысл стрелок на рисунке А, а на рис.20. подпись к масштабному отрезку "500 нм" прочитывается с большим трудом.

#### Опечатки

Ниже приводится единственный пример, когда опечатка приводит к искажению смысла подписи к рис.35 (стр.86): « (+24) нуклеотид находится в активном центре РНКП», при том что явно идет речь о нуклеотиде (+42).

Хочется подчеркнуть, что эти замечания и возникшие вопросы ни в коей степени не умаляют достоинств работы, которая является исключительно актуальным и важным исследованием, позволяющим значительно продвинуться в понимании процессов транскрипции нуклеосомной ДНК, как с точки зрения биофизики, так и в более широком контексте биомедицинских тематик.

**Заключение.** Работа Волох О.И. представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, выполненное на высоком научном и методическом уровне. Не оставляет сомнений ни научная новизна, ни практическая значимость работы.

Диссертационная работа «Исследование взаимодействий ДНК с лигандами методами компьютерного моделирования и электронной микроскопии» удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым Министерством образования и науки Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика», а её автор, Волох Олеся Игоревна, безусловно заслуживает присуждения ей искомой ученой степени.

Отзыв подготовлен ведущим научным сотрудником лаборатории молекулярной физиологии клетки ИБК РАН В.С.Сивожелезовым, заключение утверждено на семинаре лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем ИБК РАН, ряд направлений научно-исследовательской деятельности которой (методы молекулярной динамики биомолекулярных систем, полиморфизм ДНК), соответствует тематике диссертации (протокол №1 от 14/10/2016г.).

Зав. лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биофизики клетки Российской академии наук», к.ф.-м.н.

«21» октября 2016 г.

Кондратьев Максим Сергеевич

Отзыв направляется в Диссертационный совет Д 501.001.96 при биологическом факультете Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова.

Ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биофизики клетки Российской академии наук», доктор биологических наук

«21» октября 2016 г.

В.С. Сивожелезов



Подпись В.С. Сивожелезова  
Кондратьева М.С.  
доставляю  
г.о.

## СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биофизики клетки Российской академии наук»

Адрес: 142290, г.Пушино Московской области, Институтская, 3, ИБК РАН

Телефоны: (4967) 73-05-19; (4967) 33-05-09

Факс: (4967) 33-05-09

Электронная почта: admin@icb.psn.ru

Адрес сайта: <http://www.icb.psn.ru>

Перечень опубликованных трудов ведущей организации по теме диссертации:

- 1) Polozov, R. V., Montrel, M., Ivanov, V. V., Melnikov, Y., & Sivozhelezov, V. S. (2006). Transfer RNAs: electrostatic patterns and an early stage of recognition by synthetases and elongation factor EF-Tu. *Biochemistry*, 45(14), 4481-4490.
- 2) Chirgadze, Y. N., Zheltukhin, E. I., Polozov, R. V., Sivozhelezov, V. S., & Ivanov, V. V. (2009). Binding regularities in complexes of transcription factors with operator DNA: Homeodomain family. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 26(6), 687-700.
- 3) Chirgadze, Y. N., Sivozhelezov, V. S., Polozov, R. V., Stepanenko, V. A., & Ivanov, V. V. (2012). Recognition rules for binding of homeodomains to operator DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 29(4), 715-731.
- 4) Sorokin, A. A., Temlyakova, E. A., Dzhelyadin, T. R., & Kamzolova, S. G. (2015). 37 Spatial organisation of electrostatic interactions between T7 specific RNA polymerase and its native promoters. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33(sup1), 25-26.
- 5) Masulis, I. S., Babaeva, Z. S., Chernyshov, S. V., & Ozoline, O. N. (2015). Visualizing the activity of Escherichia coli divergent promoters and probing their dependence on superhelical density using dual-colour fluorescent reporter vector. *Scientific reports*, 5. Polozov, R. V., Sivozhelezov, V. S., Chirgadze, Y. N., & Ivanov, V. V. (2015). Recognition rules for binding of Zn-Cys2His2 transcription factors to operator DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33(2), 253-266.
- 6) Melekhov, V. V., Shvyreva, U. S., Timchenko, A. A., Tutukina, M. N., Preobrazhenskaya, E. V., Burkova, D. V., ... & Ozoline, O. N. (2015). Modes of Escherichia coli Dps Interaction with DNA as Revealed by Atomic Force Microscopy. *PloS one*, 10(5), e0126504.
- 7) Kordyukova, M. Y., Antipova, V. N., Rogachevsky, V. V., & Zyrina, N. V. (2016). An acid precipitation technique: A strip assay for the large-scale DNA polymerase activity screening. *Analytical Biochemistry*, 513, 39-42.
- 8) Tutukina, M. N., Potapova, A. V., Vlasov, P. K., Purtov, Y. A., & Ozoline, O. N. (2016). Structural modeling of the ExuR and UxuR transcription factors of E. coli: search for the ligands affecting their regulatory properties. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-9.

Ученый секретарь ФГБУН ИБК РАН,

«21» октября

2016г.



к.б.н. Масулис Ирина Станиславовна