



ООО «СибЭнзим»

630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12

E-mail: info@sibenzyme.ru

<http://www.sibenzyme.ru>

Тел.: (383) 333-49-91

Тел/Факс: (383) 333-68-53

ОТЗЫВ

официального оппонента Гончара Д.А. на диссертационную работу Дятловой Евгении Алексеевны «Механизмы поиска повреждений ДНК-гликозилазами суперсемейств «спираль-два поворота-спираль» и « α/β -укладка», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – «биохимия»

Диссертационная работа Дятловой Е.А. посвящена исследованию механизмов поиска мишеней некоторыми ферментами систем эксцизионной репарации оснований (ЭРО), такими, как эндонуклеаза VIII *E. coli*, ДНК-гликозилазы NEIL1 и NEIL2 мыши, урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli* и вируса осповакцины. Актуальность представленной работы связана с важностью изучения систем репарации ДНК, как неотъемлемой части жизнеобеспечения отдельной клетки, и всего организма в целом. Окислительные повреждения оснований, часто встречающиеся в ДНК, вносят значительный вклад в процессы онкогенеза, старения и многих патологий. Именно система ЭРО препятствует накоплению этих повреждений, и является, таким образом, важнейшим фактором, обеспечивающим целостность генома клетки.

За прошедшие годы для некоторых ДНК-гликозилаз механизмы поиска повреждений были достаточно хорошо изучены, в то время как другие ферменты остаются в этом отношении малоисследованными. Так, из числа ДНК-гликозилаз, принадлежащих к структурному суперсемейству «спираль — два поворота — спираль» (H2TH), основная часть работ по механизмам поиска выполнена на формамидопиримидин-ДНК-гликозилазе (Fpg) *Escherichia coli* и *Geobacillus stearothermophilus*, однако другие ферменты из этой группы, заметно отличающиеся от Fpg по своей специфичности — эндонуклеаза VIII (Nei) бактерий и ее эукариотические гомологи NEIL1 и NEIL2 — практически не исследовались. Даже для более тщательно изученных ДНК-гликозилаз — например, урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli* (UNG), принадлежащей к структурному суперсемейству α/β -укладка — остаются открытыми многие вопросы, связанные с характером их передвижения по ДНК и взаимодействия с другими молекулами. Никогда не изучалась и собственная процессивность такой важной с

точки зрения патогенности урацил-ДНК-гликозилазы вируса осповакцины (vVUNG), которая помимо участия в репарации, играет роль процессивной субъединицы вирусного репликативного комплекса. В этой связи диссертационная работа Дятловой Е.А. решает важные исследовательские задачи, и, несомненно, является актуальной и своевременной.

Диссертация написана в традиционной форме. Она изложена на 125 страницах, содержит 49 рисунков, 11 таблиц, 1 приложение и список литературы, включающий 262 ссылки. Диссертация состоит из девяти разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список цитированной литературы», «Приложения».

Во **«Введении»** автор перечисляет основные ферменты систем ЭРО прокариот и эукариот, описанные к настоящему времени, и кратко излагает состояние вопроса в области изучения механизмов поиска мишеней этими белками. Также автор обосновывает теоретическую и практическую значимость работы по выбранной теме, формулирует цель работы и те задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели.

Глава **«Обзор литературы»**, состоящая из пяти основных разделов, посвящена всестороннему описанию накопленных к настоящему времени данных о типах повреждений в ДНК, способах их репарации и ферментах, участвующих в устранении этих повреждений. Автором собрана и проанализирована информация об известных на сегодня механизмах процессивности ДНК-зависимых белков и механизмах поиска повреждений ДНК-гликозилазами. При этом отмечается, что практически все ранее исследованные ДНК-гликозилазы осуществляют поиск повреждений в ДНК с использованием механизмов одномерной диффузии, однако эффективность и характеристики этого процесса могут значительно отличаться у разных гликозилаз и требуют более детального изучения.

Хочется отметить, что текст обзора написан хорошим и понятным литературным языком, отличается высоким качеством изложения материала, проиллюстрирован двадцатью шестью рисунками и шестью таблицами. Обращает на себя внимание не только широкая эрудиция диссертанта в вопросах, касающихся темы исследования, но и способность Дятловой Е.А. всесторонне и критически анализировать имеющиеся литературные источники.

В главе **«Материалы и методы»** приводится описание стандартных методов генной инженерии, молекулярной биологии, биохимии и компьютерного моделирования, использованных диссертантом в работе. Помимо этого, для изучения механизмов поиска мишеней ферментами репарации в работе был использован биохимический метод,

разработанный в лаборатории, где выполнялось исследование. Метод основан на измерении вероятности коррелированного расщепления (probability of correlated cleavage, P_{cc}) олигонуклеотидных субстратов, содержащих два повреждения.

Результаты и их обсуждение приведены в 4-ой главе диссертации. Здесь можно выделить три логически связанных между собой блока исследований:

В результате выполнения первого блока были исследованы механизмы поиска повреждений ферментами *Nei* *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши. Для изучения процессивности этих ферментов был использован метод, основанный на измерении P_{cc} олигонуклеотидного субстрата, содержащего два сайта-мишени ДНК-гликозилаз. Сначала были определены стационарные кинетические параметры расщепления ферментами 20-звенных дуплексов, каждый из которых представлял собой половину от целого 40-звенного субстрата. Оказалось, что белки *Nei*, NEIL1 и NEIL2 взаимодействуют с обеими частями субстрата с одинаковой эффективностью. Далее было изучено влияние катионов K^+ и Mg^{2+} на эффективность одномерной диффузии ферментов. Показано, что только для NEIL1 характер кривой полностью соответствовал ожидаемой зависимости для процессивного фермента: значение P_{cc} достигало 0,48 в отсутствие ионов металлов и падало с увеличением их концентрации. NEIL2 практически не использовала процессивный поиск ($P_{cc} = 0,1$), а *Nei* показывала средние значения P_{cc} от 0,28 до 0,21. Кроме того, экспериментально было показано, что процессивность ферментов *Nei* и NEIL1 практически не зависит от расстояния между повреждениями в диапазоне от 20 до 80 п.н.

В ходе выполнения второго блока изучалось влияние ковалентного аддукта и нековалентных лигандов на эффективность коррелированного поиска мишеней ДНК-гликозилазой UNG *E. coli*. Показано, что присутствие объемного ковалентного аддукта между сайтами связывания фермента значительно снижает его способность к одномерной диффузии по двуцепочечной ДНК, но не влияет на механизм поиска повреждений в одноцепочечной. При исследовании влияния нековалентно связанных с ДНК молекул лигандов, блокирующих либо большую, либо малую бороздки, оказалось, что присутствие триплексообразующего олигонуклеотида в большой бороздке в концентрациях до 50-100 мкМ слабо влияло как на активность, так и на процессивный поиск UNG. При более высоких концентрациях лиганда значительно сильнее ингибировалась активность фермента, чем P_{cc} . В случае же использования ДНК-субстрата с лигандом в малой бороздке наблюдался значительный спад активности и P_{cc} UNG уже при минимальной концентрации 1 мкМ. На основании полученных результатов автор делает вывод, что UNG *E. coli* при сканировании ДНК в значительной степени использует механизм

хопшинга, который позволяет ферменту преодолевать препятствия в виде различных ДНК-связывающих молекул в клетке, в том числе некоторых других ферментов.

Третья часть главы посвящена подробному исследованию процессивности UNG вируса осповакцины (vvUNG). Экспериментально было показано, что vvUNG осуществляет процессивный поиск мишеней в ДНК в условиях низкой ионной силы гораздо эффективнее (значение P_{cc} оказалось равным 0,68) по сравнению с UNG *E. coli* ($P_{cc} = 0,3$). Постепенное увеличение концентрации KCl в растворе до 200 мМ значительно снижало P_{cc} (почти в 7 раз), что указывает на активное использование вирусной UNG процессивного поиска с существенным вкладом механизма скольжения по ДНК. Присутствие в растворе ионов Mg^{2+} оказывало еще более значительный эффект (падение P_{cc} более, чем в 7 раз), что может объясняться гораздо более прочным взаимодействием ионов Mg^{2+} с ДНК по сравнению с одновалентными катионами. Так же было показано, что эффективность процессивного поиска vvUNG не снижается при наличии между повреждениями коротких брешей (2, 4 и 6 нуклеотидов), т.е. одноцепочечные участки ДНК не препятствуют перемещению фермента. Помимо этого, эксперименты показали, что vvUNG обладает практически одинаковой способностью связываться как с поврежденной, так и с неповрежденной ДНК. Исследование зависимости P_{cc} вирусной гликозилазы от расстояния между повреждениями показало, что эффективность транслокации от одного сайта к другому резко падала с увеличением расстояния от 20 до 40 п.н., а затем продолжала снижаться более плавно. При этом значения P_{cc} на всем исследуемом диапазоне расстояний были выше значений UNG *E. coli* в тех же условиях. В результате делается заключение, что высокая процессивность поиска мишеней vvUNG согласуется с ее ролью фактора процессивности репликативного комплекса вируса осповакцины. В последней части блока приведены результаты моделирования одномерного блуждания vvUNG, и проведено исследование возможности подавления активности вирусной гликозилазы химическими соединениями класса тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиденов из библиотеки потенциальных ингибиторов UNG.

Итоговая часть диссертации, раздел «**Заключение**», органично завершает работу. В нём ещё раз подчёркиваются основные моменты диссертации и их научное значение для понимания механизмов поиска повреждений ДНК пятью ферментами репарации – эндонуклеазой VIII (Nei) *E. coli*, ее эукариотических гомологов NEIL1 и NEIL2 мыши, урацил-ДНК-гликозилазами *E. coli* и вируса осповакцины. Задача исследовать процессивность ДНК-гликозилаз суперсемейства H2TH была продиктована необходимостью сравнить хорошо изученный в этом отношении фермент Fpg с белками Nei, NEIL1 и NEIL2, для которых такие данные практически отсутствуют.

Проделанная работа в целом внесла существенный вклад в развитие экспериментальных методов определения процессивности ферментов с помощью ДНК-субстратов, содержащих два сайта-мишени. Так, для изучения влияния на процессивный поиск мишеней внутриклеточных молекул, взаимодействующих с ДНК, впервые были предложены соединения небелковой природы, связывающиеся с ДНК нековалентно в малой и большой бороздках. Так же впервые показано, что UNG *E. coli* способна преодолевать такие нековалентные лиганды в процессивном режиме, тогда как ковалентные аддукты существенно снижают процессивность фермента на двуцепочечной ДНК, в отличие от одноцепочечной.

Необходимо отметить, что полученные диссертантом новые данные имеют фундаментальное значение для понимания механизмов поиска повреждений ДНК-гликозилазами и механизмов эксцизионной репарации оснований ДНК в целом, а также для характеристики свойств репликативного комплекса вирусов семейства *Rovviridae*. Обнаруженные ингибиторы вирусной UNG потенциально могут стать базой для создания новых терапевтических средств против инфекций, вызванных ортопоксвирусами, в частности, таких опасных для человека заболеваний, как натуральная оспа и оспа обезьян. Научная ценность и актуальность работы подтверждается публикациями в научных изданиях.

Диссертационная работа Дятловой Е.А. представляет собой законченное научное исследование. Выводы, сформулированные в диссертации, адекватны полученным результатам. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Несомненным является тот факт, что Дятловой Е.А. проделана объёмная и достаточно сложная в методическом исполнении работа. Исследования выполнены с применением современных методов биохимии, молекулярной биологии и компьютерного моделирования. Достоверность представленных в диссертации результатов и обоснованность выводов не вызывают сомнений. Материалы исследования апробированы на семи российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Серьезных замечаний к представленной диссертации нет. Но, в то же время, можно выделить несколько моментов, требующих пояснения:

1. При изучении коррелированного расщепления субстратов ферментами Nei, NEIL1 и NEIL2 (глава «Материалы и методы», с.58 и глава «Результаты и их обсуждение», с. 66-68) использовался базовый реакционный буфер на основе Tris-HCl, pH 7,5, и исследовалась зависимость эффективности расщепления олигонуклеотидных субстратов от концентрации $MgCl_2$ (в диапазоне 0-25 мМ) и KCl (в диапазоне 0-200 мМ).

Результаты, представленные на с.68, показывают, что вероятность расщепления двуцепочечного субстрата значимо возрастала для Nei и NEIL2 при увеличении концентрации $MgCl_2$ до 20 мМ. При добавлении KCl от 50 до 200 мМ эффективность одномерной диффузии для Nei и NEIL1 падала, а для NEIL2 значения P_{cc} составляли не более 0,1 во всем диапазоне концентраций ионов K^+ . Из чего автор делает вывод о том, что поиск мишени осуществляется Nei и NEIL1 процессивно, а не путем диффузии в трех измерениях. Однако эффективность работы ДНК-гликозилаз в присутствии ионов Na^+ и при разных значениях pH окружающей среды не изучалась, тогда как из опубликованных данных известно, что эти факторы могут оказывать влияние на активность и, соответственно, процессивность подобных ферментов. Например, на с.18 диссертации отмечено, что оптимальными условиями ферментативной реакции для фермента NEIL1 человека являются pH 9,5 и 100-150 мМ NaCl. Для гликозилазы AAG человека максимальная эффективность одномерной диффузии достигается при концентрации NaCl 200 мМ (с.50 диссертации). Фермент эндонуклеаза VIII (Nei) из *E. coli* проявляет максимальную активность при 75 мМ NaCl и pH 8,0, а для гликозилазы Fpg оптимальный буфер имеет pH 7,0 (каталог New England BioLabs). В связи с этим, было бы интересно проверить зависимость эффективности коррелированного расщепления субстратов ферментами Nei, NEIL1 и NEIL2, изучаемыми в данной работе, от pH реакционного буфера и концентрации NaCl.

2. Для определения биохимических свойств ДНК-гликозилаз Nei, NEIL1 и NEIL2 в реакцию брали 5 нМ ферментов Nei и NEIL1, 10 нМ NEIL2 и 0,12 нМ $\nu\nu$ UNG. Однако, с практической точки зрения и для удобства было бы целесообразно определить специфическую активность этих ферментов (в ед.акт./мл) с учетом того, что их субстратная специфичность, в принципе, уже изучена. Такая активность ранее была определена для таких ДНК-гликозилаз, как UNG и Fpg *E. coli*, AAG и OGG1 человека.

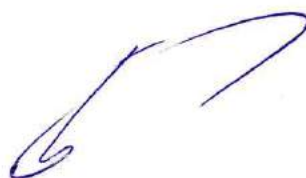
3. В разделе 4.3.7. « $\nu\nu$ UNG как мишень для противовирусной терапии» изучали влияние некоторых химических соединений, потенциальных ингибиторов UNG, на процессивность вирусной ДНК-гликозилазы. Каждое соединение проверяли в 3-х концентрациях – 10, 100 и 1000 мкМ. Было показано, что некоторые молекулы ингибировали вирусную UNG значительно сильнее, чем UNG человека, а 5 из них (2D, 3A, 3B, 4B и 4F) подавляли активность вирусной UNG примерно на 50% и более при 100 мкМ концентрации. Отсюда делается вывод, что на основе таких низкомолекулярных соединений, снижающих процессивность $\nu\nu$ UNG, могут в будущем создаваться препараты против поксвирусов. И хотя в работе показано, что цитотоксичность выбранных соединений при 100 мкМ оказалась умеренной, их безопасность для здоровья

человека остается под вопросом и требует более тщательного изучения. В качестве компромисса может быть рассмотрено такое соединение, как 4E (рис.47, с 91; приложение 1, с.124), которое при минимальной концентрации 10 мкМ показывает уровень подавления активности vvUNG почти на 50% и практически не влияет на активность UNG человека. Сочетание такого соединения с препаратом, содержащим ионы K^+ , которые тоже существенно ингибируют процессивность vvUNG, может послужить прототипом противовирусного препарата с минимальной цитотоксичностью для человека.

Однако, перечисленные замечания носят рекомендательный характер, никак не влияют на общее очень хорошее впечатление от работы и не снижают её значимости как самостоятельного исследования.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание ученой степени кандидата наук, а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации Дятлова Евгения Алексеевна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Гончар Данила Александрович,
кандидат биологических наук,
зам. директора по производству
ООО «СибЭнзайм».
Тел.: (383)-209-27-40; 8-913-929-0954
E.mail: gonchar@sibenzyme.ru



Гончар Д.А.

Подпись к.б.н. Д.А. Гончара
ЗАВЕРЯЮ
Яковлев Владимир Георгиевич,
директор ООО «СибЭнзайм»,



Яковлев В.Г.

30 мая 2023 г.