

## О Т З Ы В

официального оппонента о работе **Дятловой Евгении Алексеевны**  
**Механизмы поиска повреждений ДНК-гликозилазами суперсемейств «спираль-два поворота-спираль» и « $\alpha/\beta$ -укладка»,** представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Стабильность генетической информации в живой клетке – ключ к ее нормальному функционированию. Носитель этой информации – ДНК. Известно, что ДНК в клетке постоянно подвергается разрушающим воздействиям: как химическому (эндо- и экзогенному), так и физическому (УФ и ионизирующее излучение), в результате которых в молекуле могут появляться повреждения. Суммарное количество спонтанных повреждений ДНК в одной клетке может достигать порядка  $10^5$  в день, а, например, нахождение в течение дня под ярким солнечным светом дополнительно индуцирует до  $10^5$  фотосшивок в каждой клетке кожи. По размеру повреждения можно разделить на крупные (разрывы цепи, сшивки, объемные аддукты) и небольшие, которые, как правило, представляют собой модифицированные азотистые основания. Считается, что по пути эксцизионной репарации оснований из ДНК удаляется большинство необъемных повреждений азотистых оснований. Ключевыми ферментами в этом пути являются ДНК-гликозилазы, которые обнаруживают поврежденные нуклеотиды.

Несмотря на большой интерес к исследованию механизмов специфического узнавания поврежденных нуклеотидов в ДНК ферментами репарации, в том числе ДНК-гликозилазами, до сих пор непонятным остается вопрос, каким образом эти ферменты находят в ДНК свои специфические сайты среди огромного числа неповрежденных нуклеотидов.

Безусловно, в настоящее время изучение механизмов поиска повреждений в ДНК как ключевого этапа, отвечающего за эффективность всего процесса репарации, является одним из динамично развивающихся направлений молекулярной биологии и биохимии. А одним из актуальных вопросов является разработка низкомолекулярных соединений-эффекторов, влияющих на общую эффективность репарационного процесса. Следует отметить, что изучение механизмов поиска повреждений ДНК-гликозилазами, а также эффекторов этих ферментов, осложняется структурным разнообразием данных ферментов, так в клетках человека экспрессируется 11 ДНК-гликозилаз, принадлежащих к четырем различным структурным семействам.

В связи с вышесказанным, диссертационная работа Евгении Алексеевны Дятловой, посвященная изучению механизмов поиска повреждений ДНК-гликозилазами, является

своевременной и актуальной. Несмотря на то, что данная работа не дает исчерпывающего ответа на вопрос инициации репарационного процесса, начиная со стадии поиска повреждения ДНК-гликозилазами, полученные данные вносят существенный вклад в эту область. Соискатель сконцентрировал внимание на двух структурных семействах ДНК-гликозилаз – это семейство «спираль-два поворота-спираль», из которого в рамках диссертационной работы были исследованы три представителя Nei из *E. coli* и NEIL1 и NEIL2 мыши и семейство ферментов « $\alpha/\beta$ -укладка», представленное урацил-ДНК-гликозилазами из *E. coli* и осповакцины. На пути достижения основной цели диссертации Евгения Алексеевна выполнила систематическое исследование с использованием оригинального подхода для анализа процессивности ферментов и на примере перечисленных ДНК-гликозилаз ею были детально изучены свойства этих ферментов.

Сильной стороной данной работы является ее существенный вклад в развитие экспериментального биохимического подхода к определению процессивности ферментов с помощью ДНК-субстратов, содержащих два специфических сайта. С помощью данного подхода соискателем впервые показано, что ферменты, входящие в структурное семейство «спираль-два поворота-спираль», отличаются друг от друга по способности вести процессивный поиск повреждений в ДНК. Действительно, совокупность полученных данных позволила сделать заключение о том, что ферменты Nei из *E. coli* и NEIL1 и NEIL2 мыши имеют значительные различия в механизмах поиска поврежденных оснований в ДНК. Установлено, что NEIL1 использует при поиске процессивный механизм, в то время как NEIL2 к нему практически не способен, а для фермента Nei наблюдается промежуточная ситуация. Очень важным заключением, на мой взгляд, является то, что полученные данные согласуются с гипотезой о существовании двух конформационных популяций ферментов с характерной дистанцией поиска более 80 нуклеотидов в сканирующей конформации.

В работе впервые показано, что фермент Ung *E. coli* в процессивном режиме способен преодолевать нековалентные лиганды, такие как разрывы и нековалентно связанные лиганды в малой и большой бороздке, однако ковалентные аддукты ДНК значительно снижают процессивность фермента на двуцепочечной ДНК, вероятно, за счет искажения ее структуры и изменения жесткости. При этом изменения, возникающие в одноцепочечной ДНК в присутствии ковалентного аддукта, не оказывают заметного влияния на механизм поиска этим ферментом.

Значительная часть работы посвящена характеристике процессивности ДНК-гликозилазы вируса осповакцины. Этот фермент играет роль фактора процессивности вирусного репликативного комплекса. Показано, что Фермент vvUNG вируса

осповакцины осуществляет процессивный поиск мишеней в ДНК, более эффективный по своим значениям, чем поиск ферментом Ung *E. coli*. Действительно, проведенные в работе количественные оценки показывают, что присутствие субъединицы vvUNG приводит к повышению процессивности вирусной ДНК-полимеразы с  $< 10$  до нескольких тысяч включенных нуклеотидов за один акт ассоциации.

Научная значимость работы Дятловой Е.А. значительно возрастает за счет того, что в ней апробирован принципиально новый подход к ингибированию общей эффективности репарационного процесса, а именно ингибирование не только каталитической активности отдельных ферментов, но и подавление процессивности данных ферментов. В этом направлении проведены исследования и соискателю удалось выявить ряд соединений класса тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиденов способных как ингибировать активность фермента vvUNG, так и подавлять его процессивность.

Представленная работа написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 125 страницах и содержит 49 рисунков и 11 таблиц. Библиография включает 262 литературных источника.

Обзор литературы включает описание процесса эксцизионной репарации оснований, а также путей возникновения и удаления распространенных повреждений ДНК, узнаваемых ДНК-гликозилазами. В обзоре рассмотрены ферментативные свойства и пространственные структуры изучаемых в работе ДНК-гликозилаз и описаны механизмы процессивности ДНК-зависимых белков. К техническому замечанию по оформлению этой части диссертационной работы можно отнести отсутствие некоторых разделов Обзора литературы в Оглавлении.

Экспериментальная часть работы достаточно полно описывает все условия проведенных экспериментов. В диссертационной работе были использованы современные методы, находящиеся в арсенале молекулярной биологии и биохимии, включающие клонирование генов и создание экспрессионных конструкций, очистка рекомбинантных белков, определение кинетических параметров ферментативного процесса, компьютерное моделирование и другие.

Все полученные в данной работе результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну работы. В разделе результатов корректно отражен личный вклад автора в случаях представления блоков работы, полученных в совместных исследованиях с коллегами. В разделе заключение автор обобщает все части работы, после чего формулирует корректные и полностью обоснованные выводы.

Работа опубликована в 3 научных статьях в тематических отечественных и зарубежных журналах. Материалы работы были представлены на международных и российских конференциях.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работ по данному вопросу.

В целом необходимо отметить, что текст диссертации написан хорошим русским языком, а имеющиеся в работе единичные мелкие опечатки, неудачные формулировки, а также выборочное представление разделов диссертации в Оглавлении диссертационной работы, конечно, не носят принципиального характера и не влияют на общую высокую научную значимость полученных автором результатов и сформулированных выводов.

Подводя итог, необходимо отметить, что, без сомнения, результаты работы служат важнейшим шагом на пути понимания молекулярных механизмов реализации одного из важнейших клеточных процессов – процесса репарации ДНК. Данные, полученные в работе, представляют значительную ценность для молекулярной биологии, биохимии, физико-химической биологии и смежных наук.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, и оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах, а ее автор, Евгения Алексеевна Дятлова, без сомнения, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Доктор химических наук,  
заведующий лабораторией генетических технологий  
федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук

Кузнецов Никита Александрович



Подпись Кузнецова Н.А. завершено  
це. секретарь ИХБФМ  
Погашенко Е.Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН). Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8  
Тел.: +7 (383) 363-51-75, e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

30 мая 2023 г.