

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Дятловой Евгении Алексеевны «Механизмы поиска повреждений ДНК-гликозилаз мисуперсемейств "спираль — два поворота — спираль" и " α/β -укладка"» представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Диссертационная работа Дятловой Е. А. посвящена определению механизмов поиска повреждений в ДНК белками системы эксцизионной репарации оснований из двух структурных суперсемейств: "спираль — два поворота — спираль" (эндонуклеазы VIII *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши) и " α/β -укладка" (урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli* вируса осповакцины).

Известно, что в геноме человека в каждой клетке спонтанно возникает более 20 000 повреждений в день. Для противодействию процессам повреждения ДНК в клетках существует специализированная система защиты ДНК от повреждений - система репарации ДНК, которая состоит из десятков ферментов, обладающих уникальной специфичностью к различным повреждениям ДНК. Важная роль в этих процессах отводится ДНК-гликозилазам, которые распознают и удаляют поврежденные основания в ДНК. и эндонуклеазам VIII, узнающим окисленные пиримидиновые основания. Эти ферменты, несмотря на общую субстратную специфичность, способны с разной эффективностью репарировать ДНК разной структуры. Урацил-ДНК-гликозилазы удаляют из ДНК основания урацила. Механизмы узнавания и катализа ДНК-гликозилаз изучены достаточно хорошо, однако то, как эти белки ищут свои специфические поврежденные основания среди большого избытка нормальных нуклеотидов ДНК без затрат энергии — важный вопрос в современной энзимологии. За прошедшие годы механизмы поиска были изучены для некоторых ферментов систем эксцизионной репарации оснований и эксцизионной репарации нуклеотидов, также большой сегмент исследований составляет изучение транскрипционных факторов и эндонуклеаз рестрикции. В этой области активно применяются современные методы одномолекулярной микроскопии, биохимические подходы, а также расчетные методы. Таким образом, работа Дятловой Е. А. вписывается в контекст мировых исследований, и ее актуальность не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Дятловой Е. А. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 262 наименования. В работе имеется приложение, содержащее информацию о низкомолекулярных соединениях, использованных в работе.

Обзор литературы дает подробную информацию о системе эксцизионной репарации оснований ДНК и о повреждениях, узнаваемых ДНК-гликозилазами. Освещены структурные и функциональные аспекты суперсемейств ДНК-гликозилаз, исследованных в работе. Значительную часть литературного обзора составляет описание механизмов поиска мишеней ДНК-зависимыми белками, методов изучения этих механизмов и актуальных данных об уже исследованных ДНК-гликозилазах. В целом литературный обзор полностью отвечает поставленным задачам.

Глава «Материалы и методы» содержит описание как классических методов биохимии и молекулярной биологии, так и авторскую методику определения коррелированного расщепления субстратов с двумя повреждениями, современные биохимические методы определения параметров взаимодействия молекул (метод микромасштабного термофореза, метод остановленной струи), компьютерное моделирование. Методы исследования описаны с достаточной степенью детализации.

Результаты работы и их обсуждение оформлены в виде главы, содержащей 3 отдельных раздела (4.1–4.3). Раздел 4.1 посвящен механизмам поиска повреждений ферментами суперсемейства "спираль — два поворота — спираль", на основе структурных данных предложена интерпретация полученных результатов. В разделе 4.2 изучено влияние некоторых средовых факторов на процессивность урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli*, а именно присутствия объемного ковалентного аддукта и нековалентных ДНК-связывающих лигандов малой и большой бороздки ДНК. Раздел 4.3 посвящен урацил-ДНК-гликозилазе вируса осповакцины, осуществляющей функцию фактора процессивности вирусного репликативного комплекса. Представлены данные о собственной процессивности фермента, предложена модель одномерного блуждания с потерями. Заключительная часть раздела посвящена поиску потенциального фармакофора для подавления репликации поксвирусов.

В ходе работы соискателем показано, что несмотря на гомологию и общую пространственную укладку ферментов суперсемейства "спираль — два поворота — спираль", их способность вести процессивный поиск мишеней варьирует в широком диапазоне от высокой эффективности в случае фермента Fpg, до крайне низкой для NEIL2, что согласуется с предполагаемыми клеточными функциями ферментов суперсемейства. В работе впервые предложены соединения небелковой природы, связывающиеся с ДНК нековалентно в малой и большой бороздках ДНК, и показано, что Ung *E. coli* способна преодолевать такие нековалентные лиганды в процессивном режиме, в отличие от ковалентных аддуктов ДНК. Показано, что урацил-ДНК-гликозилаза вируса осповакцины осуществляет процессивный поиск мишеней в ДНК более эффективно, чем Ung *E. coli*, что согласуется с ее ролью как фактора процессивности репликативного комплекса вируса. Получено значение

вероятности диссоциации фермента на каждом шаге, из чего сделана количественная оценка среднего смещения фермента на один акт связывания с ДНК. Предложены соединения класса тетрагидро-2,4,6- триоксопиримидинилиденов, которые способны ингибировать активность и процессивность фермента. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, во всех случаях представляется вполне аргументированной.

Можно сделать ряд замечаний к работе::


1. Часть, посвященная влиянию аддуктов и ДНК-связывающих лигандов на процессивность урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli*, по сравнению с остальными частями работы выглядит гораздо менее объемной. Возможно, ее стоило бы объединить с частью по урацил-ДНК-гликозилазе вируса осповакцины, где также было изучено влияние аддуктов на процессивность, тем более что эти белки относятся к одному структурному семейству.
2. В первой части работы постулируется наличие двух состояний – сканирующего и скользящего – у белков Nei и NEIL1. Однако в частях, посвященных урацил-ДНК-гликозилазам, эта модель вообще не рассматривается. Почему? Могут ли полученные данные по урацил-ДНК-гликозилазам быть объяснены с ее помощью?
3. P_{ss} как количественная характеристика процессивности привязана к строго определенной экспериментальной системе, использованной в диссертации, и не позволяет прямого сравнения с литературными данными о процессивности других белков в других системах. Например, остается неясным процессивность исследованных в диссертации белков больше или меньше процессивности факторов транскрипции или рестриктаз? Стоило бы приводить в диссертации более понятные и стандартные количественные характеристики – например, коэффициент диффузии.
4. Непонятно, могут ли сделанные на основе работы выводы быть подтверждены *in vivo*. Сложность исследований любых кинетических параметров ферментов в живой клетке понятна, но, раз уж диссертант упоминает о существовании таких работ, хотелось бы в тексте видеть описание методов исследования процессивности *in vivo* и возможности проведения таких экспериментов для изученных в диссертации белков.

Сделанные замечания в целом не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Работа Дятловой Е. А. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованных автором работ по данной теме.

Диссертационная работа Дятловой Е. А. является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена задача определения механизмов поиска повреждённых нуклеотидов ДНК-гликозилазами суперсемейств "спираль — два поворота — спираль" и "α/β-укладка", имеющая существенное значение для выявления механизмов поиска ДНК-зависимыми белками специфических сайтов ДНК.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что по актуальности темы, объёму, 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.

Главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», доктор биологических наук, профессор

 — Тарантул В. З.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Адрес: 123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Телефон: 8-499-196-00-02

Эл. адрес: ninaslava130@yandex.ru

Подпись Тарантула Вячеслава Залмановича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»



Борисов К.Е.

15 мая 2023 г.

