

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе **Кладовой Ольги Алексеевны** «*Конформационная динамика ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII в процессе взаимодействия с ДНК*», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности **03.01.04** – “*биохимия*”

ДНК всех организмов постоянно подвергается разнообразным и многочисленным модификациям при воздействии множества факторов различной природы. Окислительные повреждения азотистых оснований лежат в основе возникновения и развития самых разнообразных негативных последствий для организмов в ходе их онтогенеза. От того, как клетка способна исправлять данные модификации, зависит тот сценарий, по которому данная клетка реализует свой потенциал: будет ли клетка функционально полноценной, трансформируется или же погибнет. К настоящему моменту в клетках эукариот идентифицированы основные механизмы и ферменты, задействованные в процессе репарации окисленных азотистых оснований в составе ДНК. Очевидно, что эти механизмы множественны, они часто перекрываются и дублируются, обеспечивая надежность процесса репарации. Однако детали распознавания конкретных повреждений ключевыми белками их репарации – ДНК-гликозилазами остаются во многом не исследованными. В связи с этим **актуальность** работы по исследованию особенностей конформационной динамики фермент-субстратных комплексов в процессе образования каталитически-компетентного состояния на примере ДНК-гликозилаз EndoIII и EndoVIII, не вызывает сомнений.

**Научная новизна работы** определяется тем, что в результате исследования было решено несколько важных как прикладных, так и фундаментальных задач. В представленной работе произведено кинетическое и термодинамическое исследование взаимодействия двух ДНК-гликозилаз EndoIII и EndoVIII и их мутантных форм с различными ДНК-субстратами. Было продемонстрировано, что в процессе фермент-субстратного взаимодействия конформационные изменения претерпевают как сами ферменты, так и ДНК-дуплексы. На основе сопоставления данных о конформационной динамике молекул ферментов и ДНК-субстратов с известными рентгеноструктурными данными предложена молекулярно-кинетическая модель взаимодействия белков EndoIII и EndoVIII с ДНК, определены термодинамические параметры отдельных стадий взаимодействия ферментов с ДНК, а также установлена роль отдельных аминокислотных остатков в ферментативном процессе. Полученные данные позволяют углубить знания о механизмах клеточного ответа на появление в составе ДНК

окислительных повреждений, что имеет большое значение для таких практических областей, как разработка методов лучевой терапии, терапии онкозаболеваний и тд.

### **Общая характеристика**

Диссертационная работа состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и Методов, Результатов и их Обсуждения, Заключения, Выводов, Списка сокращений и Списка цитируемой литературы.

В первой главе диссертации представлен обзор литературы, в котором автор приводит сведения о структурно функциональных особенностях ДНК – гликозилаз различных семейств. Основное внимание автор уделил современным данным и представлениям о структурной организации ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII и деталям их взаимодействия с ДНК.

В целом, обзор литературы включает в себя информацию из 196 источников, большая часть которых относится к работам последних лет, и позволяет сделать вывод об актуальности, новизне и практической ценности рецензируемой диссертационной работы.

Во второй главе приведена информация об использовавшихся материалах и методах исследования. Возможно, автору следовало привести более подробную характеристику использованных в диссертационной работе клеточных линий и векторов, а также вынести в отдельный подраздел информацию об использованном приборном парке и материалах исследования. Список используемых сокращений традиционно следовало бы расположить в начале работы.

### **Основные результаты и их достоверность**

В третьей главе изложены результаты работы и их обсуждение. Раздел включает в себя 2 логических части: «Конформационная динамика ДНК-субстратов при взаимодействии с Endo III и мутантными формами Endo III» и «Конформационная динамика фермента Endo VIII, его мутантных форм и ДНК субстратов». В первой части автор убедительно доказывает, что конформационные превращения фермент-субстратных комплексов, образованных ДНК-гликозилазой Endo III дикого типа и ее мутантными формами происходят через последовательность стадий с образованием нескольких промежуточных состояний. Важным моментом является демонстрация стратегии раннего узнавания поврежденного нуклеотида с помощью вклинивания в ДНК-дуплекс аминокислотных остатков – «сенсоров» повреждения, в качестве которого выступает Leu81 у EndoIII. Показано, что замена каталитических

аминокислотных остатков Lys120 и Asp138 на Ala приводит к потере у фермента Endo III как N-гликозилазной, так и AP-лиазной активности. Второй раздел подробно описывает конформационную динамику фермента Endo VIII, его мутантных форм и ДНК субстратов. В частности, автором было установлено, что у фермента Endo VIII также присутствует аминокислотный остаток –Leu70, который встраивается внутрь ДНК-дуплекса раньше других интеркалирующих аминокислотных остатков (Gln69 и Tyr71), замена интеркалирующего аминокислотного остатка–Leu70 на Trp либо Ser приводит к значительной потере каталитической активности фермента.

Таким образом, в результате работы была установлена последовательность элементарных стадий взаимодействия ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII из *E.coli* с ДНК-субстратами и изучена конформационная динамика ферментов и ДНК, а также предложены кинетические схемы реакций. Автором впервые получены термодинамические параметры быстропротекающих стадий взаимодействия ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII с ДНК-субстратами и установлено, что затраты энергии на образование каталитически компетентных состояний фермент-субстратных комплексов, компенсируются за счет увеличения энтропии, вероятно, вследствие дегидратации области контакта фермента с ДНК-субстратом. Этот факт может иметь принципиальное значение для понимания механизмов взаимодействия ДНК-гликозилаз с ДНК в условиях окислительного стресса. В целом диссертация производит очень хорошее впечатление: автором проделан огромный объем работы, применены самые современные технологии, обсуждение литературы проведено с использованием современных литературных данных, автором найдены принципиально новые данные, сформулированы интересные гипотезы.

*По диссертационному исследованию имеются некоторые вопросы и замечания:*

1. Автором были получены препараты ферментов и их мутантных форм, которые затем использовались в работе. Автор ссылается на электрофоретический анализ гомогенности препаратов белков, однако, в Экспериментальной части отсутствует анализ их функциональной активности. Означает ли это, что таковой анализ не проводился? Полагаю, что такие данные было бы полезно привести.
2. В работе было исследовано несколько ДНК-дуплексов, содержащих различные модификации, в том числе и специфический субстрат для ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII - 5,6-дигидроуридин. В тексте диссертации не вполне объяснен

выбор именно этого повреждения, поскольку оба фермента удаляют из ДНК широкий спектр модифицированных пиримидиновых оснований. В связи с этим возникает вопрос, являются ли установленные механизмы удаления 5,6-дигидроуридина из ДНК универсальными и для других повреждений? Будет ли изменяться количество стадий в кинетической схеме при замене 5,6-дигидроурацила на другое повреждение?

Перечисленные недочеты и замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической значимости работы. Не вызывает сомнений, что результаты исследования достоверны, выполнены на достаточном материале хорошо аргументированы и подтверждены экспериментальными данными полученными с использованием современных методов проведения научных исследований. Выводы диссертационной работы корректны и полностью обоснованы полученными экспериментальными данными. По материалам диссертации опубликовано 4 научных статьи в рецензируемых журналах. Все журналы индексируются в международных базах Web of Science и/или Scopus. Результаты работы были представлены на 5 Международных и Российских конференциях. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

### **Значимость работы для науки и практики**

Полученные автором результаты по детальному исследованию механизмов распознавания ДНК-гликозилазами повреждений в составе ДНК наверняка найдут себе применение и в других областях молекулярной биологии и биохимии, включая те, которые не связаны прямо с процессами репарации. Опубликованные подходы и методики, а также новые научные данные могут найти свое применение в таких ведущих институтах РАН как - ФГБУН Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Институте биохимии имени А.Н. Баха РАН, Институте белка РАН и других научных учреждениях РФ биологического, химического и медицинского профиля.

### **Заключение**

Диссертация **Кладовой Ольги Алексеевны** является завершенным научным исследованием, выполненным автором самостоятельно на высоком научном уровне и посвященным исследованию особенностей конформационной динамики фермент-субстратных комплексов в процессе образования каталитически-компетентного

состояния на примере ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII. Выводы к диссертационной работе соответствуют поставленным цели и задачам.

Рассматриваемая диссертационная работа по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне полученных результатов полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №824), предъявляемых к кандидатским диссертациям, так как в работе решена научная задача, имеющая существенное значение для понимания механизмов репарации ДНК, а ее автор, **Кладова Ольга Алексеевна**, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности **03.01.04 – «биохимия»**.

10 июня 2019 г

Ведущий научный сотрудник лаборатории

генной инженерии ФИЦ ИЦиГ СО РАН,

к.б.н.

 /Синицына О.И./

Почтовый адрес: 630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д.10,  
E-mail: olgasin1@yandex.ru

Подпись О.И. Синицыной заверяю

Ученый секретарь ФИЦ ИЦиГ СО РАН,

к.б.н.





/Орлова Г.В. /