

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу **Кладовой Ольги Алексеевны**
«Конформационная динамика ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII в процессе
взаимодействия с ДНК»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 03.01.04 – биохимия

Представленная к защите работа Кладовой О.А. посвящена исследованию механизмов узнавания ферментами ДНК-гликозилазами поврежденных азотистых оснований нуклеотидов в процессе репарации ДНК. В настоящее время существует большое количество работ посвященных изучению природы специфичности ДНК-гликозилаз, в то же самое время ответа на вопрос как именно происходит узнавание дефектных нуклеотидов среди огромного количества неповрежденных до сих пор нет. В данной диссертационной работе автор приводит результаты кинетических исследований в предстационарных условиях двух ДНК-гликозилаз *E.coli* – Endo III и Endo VIII, принадлежащих к разным структурным суперсемействам.

Актуальность работы не вызывает сомнений, представленные исследования решают фундаментальную проблему репарации ДНК, возникающую при окислительном стрессе. Большое количество научной и научно-популярной литературы описывают проблемы связанных с окислительным стрессом, одним из следствий которого является повреждение ДНК. Зачастую такие процессы связывают с причиной старения организма. Изучение молекулярных механизмов этого процесса может позволить определить факторы, приводящие к недостаточной эффективности репарации, а в последствии разработке способов ее улучшения.

Работа изложена на 131 странице, включая страницы со списком литературы, и содержит 56 рисунков, 22 схемы и 18 таблиц. Она построена по классическому принципу и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Добавлен раздел «Список сокращений».

Литературный обзор занимает около 15% от общего объема диссертации и включает в себя описание современных исследований в области механизмов

повреждения ДНК, типов ее репарации, а также ферментов, осуществляющих этот процесс. В целом обзор современной литературы кратко, но очень емко демонстрирует уровень сложности материала, с которым столкнулся автор. Раздел «Материалы и Методы исследования» составляет около 10% от общего объема диссертации, однако подробно и описывает процедуры, использованные при проведении исследований. Раздел «Результаты и обсуждение» занимает основную долю в общем объеме диссертации.

В ходе исследований автором были исследованы конформационные изменения в структуре ДНК в процессе взаимодействия гликозилазы Endo III с G- и F-лигандами, и субстратами AP и DHU. Были проведены термодинамические исследования, которые показали, что общие термодинамические изменения между процессами связывания Endo III со специфическим и неспецифическим дуплексом имеют четкие качественные отличия. Суммарное связывание с G- и F-лигандами характеризуется положительным изменением энтропии и энтальпии, но в случае связывания с DHU-субстратом – это полностью энтальпийно-контролируемый процесс. Далее была изучена конформационная динамика ДНК-субстратов при взаимодействии с мутантными формами фермента Endo III K120A и D138A. В результате установлено, что Lys120 принимает участие не только в каталитическом процессе, но также важен при образовании первичного комплекса с ДНК и последующего узнавания повреждения, поскольку замена K120A значительно замедляет конформационные изменения ДНК. При этом замена второго каталитического остатка D138A приводит к полной потере способности Endo III нарушать структуру двойной цепи ДНК. Аналогичные исследования были проведены и для ДНК-гликозилазы Endo VIII и ее мутантных форм. Показано, что при взаимодействии фермента Endo VIII WT и его мутантной формы E2Q со всеми использованными ДНК-дуплексами наблюдается уменьшение FRET-сигнала на начальном участке кинетических кривых. Такое изменение отражает сближение концов ДНК-дуплекса, вызванное его изгибанием, при котором происходит более эффективное тушение эмиссии флуорофорной группы FAM. Из рентгеноструктурных данных известно, что при связывании фермента Endo VIII с ДНК, содержащей повреждение, происходит изгибание дуплекса, таким образом,

согласно кинетическим данным, процесс изгибания ДНК происходит уже на этапе образования неспецифического комплекса.

По результатам проведенных исследований были сформулированы 4 вывода, которые полностью обоснованы и доказаны.

Отдельно хотелось бы отметить потрясающую иллюстрированность работы. Кинетические исследования являются очень сложными для представления широкой публике и накладывают особые требования к доказательной базе, так как в отсутствие «первичных» данных они могут субъективно по-разному трактоваться. Данная работа лишена возможности к такой субъективной оценке, что безусловно большое достижение автора.

Работа выполнена на высоком экспериментальном и научном уровнях. Однако содержит ряд замечаний и недостатков:

Достаточно странным выглядит выбор представления список сокращений в конце диссертации. Большинство читателей диссертации знакомы с терминологией, однако, логичней было представить этот раздел в самом начале.

Количество ссылок в литературном обзоре 152, однако удивительно, что только 11 из них относятся к работам последнего десятилетия (с 2010 года), основная часть работ датировано последним десятилетием XX-ого века, чем объясняется такой факт?

Есть недочеты по оформлению списка литературы, так в ссылке №42 отсутствует год публикации, а в ссылке №143 – выходные данные.

В работе большое внимание уделено описанию и анализу термодинамических параметров. Эти параметры относятся рассчитаны из кинетических данных, однако в работе присутствует описание и равновесных стадий процесса, в частности для мутантных форм EndoIII K120A и D138A. Дополнение существующих данных результатами исследований в равновесных условиях, например методом ИТС, позволило бы подтвердить полученные выводы, а в случае их несоответствия дало бы возможность их скорректировать.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных статьях, опубликованных автором, результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

Диссертационная работа Кладовой О.А. полностью соответствует требованиям, «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденному постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Заведующий лабораторией
химии протеолитических ферментов
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

д.х.н.



Смирнов Иван Витальевич

117997, Россия, г. Москва,
Ул Миклухо-Маклая, 16/10
Тел. (495) 727-38-60
E-mail: smirnov@ibch.ru

Подпись д.х.н. Смирнова И.В.
«Удостоверяю»
Заместитель директора ИБХ РАН
доктор химических наук



Ямиольский И.В.

МП

«6» июня 2019 года