

ОТЗЫВ

официального оппонента д.ф.-м.н. Усачева Константина Сергеевича на диссертацию Овчеренко Сергея Сергеевича «Динамика проникновения белка RL2 в клетки человека и открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин, по данным методов магнитного резонанса», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 « Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества».

Диссертация Овчеренко Сергея Сергеевича посвящена структурно-функциональному анализу и изучению динамики двух классов объектов, имеющих отношение к проблеме онкологических заболеваний: внутренне неупорядоченному белку RL2 и мутагенному повреждению ДНК, 8-оксогуанину. Установление детальных молекулярных механизмов, лежащих в основе онкологических заболеваний, является важнейшим этапом поиска и разработки новых методов для их лечения. Согласно многоступенчатой модели развития рака развитие опухоли происходит параллельно с сериями генетических изменений, включая мутации в ряде генов – супрессоров опухолей и протоонкогенов. Одной из причин возникновения и накопления данных мутаций являются повреждения ДНК, которые не исправляются системами репарации. Окисление азотистого основания гуанина до 8-оксо-7,8-дигидрогуанина (8-оксогуанин, охoG) приводит к дестабилизации ДНК и возникновению мутаций, при которых пара гуанин – цитозин (G:C) заменяется на пару тимин – аденин (A:T). Ферменты системы репарации клетки, такие как гликозилазы, распознают охoG и либо вырезают его из пар охoG:C, либо удаляют A из пар охoG:A. Однако до сих пор детали механизма распознавания охoG гликозилазами остаются неизвестными. Потребности в синтезе АТФ у клеток, претерпевших злокачественную трансформацию и активно пролиферирующих, существенно превышают потребности обычных дифференцированных клеток. Ингибирование белков внешней мембраны митохондрий, таких как TOM70, приводит к подавлению синтеза АТФ, что индуцирует гибель опухолевых клеток. Механизм действия успешно прошедшего доклинических испытания лекарственного препарата Лактаптин, действующим веществом которого является рекомбинантный аналог фрагмента человеческого к-казеина белок RL2, заключается в связывании RL2 с митохондриальным белком TOM70 и подавлении синтеза АТФ. Однако остается неясным какие участки RL2 ответственны за его связывание с белками-мишенями, в том числе с TOM70, а также детали механизма проникновения RL2 в клетки человека. С точки зрения структурной биологии внутренне неупорядоченные белки, такие как RL2, остаются одними из наиболее сложных классов объектов для изучения, поскольку их конформация может существенно изменяться при связывании с молекулами-мишенями. Наиболее информативными для получения информации о структуре и динамике внутренне неупорядоченных белков являются методы магнитного

резонанса. Таким образом исследования методом магнитного резонанса динамики проникновения белка RL2 в клетки человека и открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин, несомненно, является **актуальной** и значимой задачей.

Научная новизна работы обусловлена тем, что автором впервые методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения определена динамика и положение участков с остаточной структурой RL2 в растворе и показано, что N-концевой участок является наиболее упорядоченным в белке и вовлечен в формирование остаточной третичной структуры RL2. Установлено, что RL2 проникает в клетки человека, преимущественно находясь в агрегированном состоянии, при этом внутри клеток человека агрегаты RL2 распадаются на отдельные белковые молекулы. С помощью разработанной методики проведения экспериментов ЭПР на живых клетках человека установлено, что клетки аденокарциномы легких человека A549 способны накапливать в себе RL2. Показана применимость спиновой метки на основе нитроксильного радикала с тетраэтильными заместителями для проведения экспериментов ЭПР в живых клетках человека на спин-меченных биомолекулах при их микромолярных концентрациях и физиологических значениях температуры. Был создан протокол с адаптацией подхода переноса намагниченности с воды CLEANEX-PM, позволяющий измерять константы скорости обмена иминопротонов с протонами воды, что позволило установить кинетические параметры процесса открытия-закрытия пар оснований дуплексов ДНК G:A, G:C, oхoG:A и oхoG:C. Установлено, что в паре oхoG:A 8-оксогуанин оказывается более доступным для белков репарации во внеспиральном положении в ДНК, в то время как в паре oхoG:C он оказывается менее доступным во внеспиральном положении в ДНК, даже больше чем гуанин, который находится в паре с цитозином. Таким образом, ферментам репарации необходимо более активно задействовать свои метастабильные конформеры для принудительного выворачивания 8- оксогуанина из спирали ДНК для дальнейшего исправления повреждения.

Результаты, полученные в диссертационной работе Овчеренко С. С. позволили на молекулярном уровне установить детали динамики проникновения белка RL2 в клетки человека и открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин. Информация о особенностях строения и организации RL2 в растворе, а также о механизмах проникновения RL2 в клетки человека, могут лечь в основу рационального дизайна новых противоопухолевых лекарственных препаратов на основе RL2, что определяет **теоретическую и практическую значимость работы**. Разработанная методика проведения экспериментов ЭПР в живых клетках человека при физиологических значениях температуры с применением спиновой метки на основе нитроксильного радикала со стерически экранированным радикальным центром открывает возможности изучения свойств биополимеров *in vivo*. Предложенный протокол с адаптацией подхода переноса намагниченности с

воды CLEANEX-PM может применяться в ЯМР лабораториях для изучения процессов обмена лабильных протонов с протонами воды в биополимерах.

Обоснованность и достоверность результатов обеспечена применением широко апробированных подходов на основе современных методов магнитного резонанса, сходимостью результатов, полученных разными методами, апробацией на международных и всероссийских конференциях, публикацией в виде трех статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных РИНЦ, Web Of Science и Scopus. Все журналы, в которых были опубликованы результаты работы, имеют высокий мировой уровень и входят в Q1 квартиль.

Диссертационная работа С.С. Овчеренко построена по традиционной схеме и состоит из введения, трех глав, результатов и выводов, списка сокращений аббревиатур и терминов, списка используемой литературы и приложения. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста. Включает 54 рисунка и 7 таблиц. Список цитируемой литературы включает 203 источника на русском и английском языках.

Во **Введении** обосновывается выбор темы и объектов исследования, сформулирована актуальность и научная значимость, формулируются цель и задачи исследования, результаты и положения, выносимые на защиту, их научная новизна, перечислены методы исследования, данные об апробации результатов, отмечен личный вклад автора.

В **Главе 1**, являющейся обзором литературы, изложены основы строения и функций внутренне неупорядоченных белков и молекул ДНК, описаны возможности методов магнитного резонанса для изучения структуры и динамики биополимеров. В целом обзор современной литературы демонстрирует уровень сложности материала, с которым столкнулся автор. Текст главы сопровождается большим количеством ссылок (171 в первой главе) и качественных иллюстраций.

В **Главе 2** детально описано изучение динамики белка RL2 в растворе и в клетках человека по данным методов магнитного резонанса. Автором показано, что RL2 проникает в клетки человека, будучи в агрегированном состоянии, при этом основной механизм проникновения RL2 в клетки человека A549 является эндоцитоз. На основе полученных экспериментальных данных было выдвинуто предположение, что агрегация RL2, стимулируя эндоцитоз, определяет способность белка проникать в клетки человека и, с другой стороны, обеспечивает доставку белковых молекул RL2 в неповрежденном состоянии до белка-мишени TOM70. Анализируя представленные данные, можно сделать вывод о широком и современном наборе методов, применяемых автором, что также свидетельствует о высоком профессиональном уровне исследователя. Особо стоит отметить мультидисциплинарность и разнообразность в применении экспериментальных подходов спектроскопии ЯМР, ЭПР, конфокальной микроскопии.

В главе 3 приведены основные результаты определения динамики открытия – закрытия пар оснований, содержащих повреждение 8-оксогуанин. Детально описан весь путь исследований начиная от адаптации подхода CLEANEX-PM для измерения эффективных констант скорости обмена иминопотонов ДНК с протонами воды, до анализа термодинамических параметров плавления дуплексов ДНК. Подача материала выполнена лаконично и доступно для специалистов из разных областей, но при этом описание всех методик дано таким образом, что возможно их воспроизведение или использование в качестве лабораторного протокола.

В конце каждой главы автором приведено обобщение полученных результатов работы. Выводы и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

К работе нет вопросов принципиального характера, которые повлияли на общую высокую оценку уровня проведенных исследований и достоверности полученных результатов, однако есть несколько замечаний:

1. Для выяснения деталей взаимодействия RL2 с белком-мишенью TOM70 можно было ввести парамагнитную метку в белок TOM70 и проанализировать методом ЭПР расстояния для комплекса с меченым парамагнитной меткой белком RL2-MTSL.
2. В аминокислотной последовательности на С-конце белка RL2 указано наличие полигистидинового тага, что может влиять на функциональные свойства белка. Почему не был использован рекомбинантный белок RL2 с отщепляемым протеазой гис-тагом на N-конце?
3. В разделе 2.4.5. не хватает указания какие именно могут существовать альтернативные эндоцитозу пути проникновения RL2 в клетки человека.
4. На некоторых рисунках используются англоязычные подписи, которые стоило перевести на русский язык.

Высказанные замечания не затрагивают основных положений, защищаемых автором, и не снижают ценности проведенного исследования и высокого качества представленной диссертационной работы. Диссертация производит впечатление законченного исследования, основанного на объемной и тщательно выполненной экспериментальной и теоретической работе. Автореферат полностью и точно отражает содержание диссертации.

Рецензируемая работа соответствует паспорту специальности 1.3.17 — «Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества» в части п. 1: «химическая и спиновая динамика элементарных процессов, экспериментальные методы исследования химической структуры и динамики химических превращений», п. 5 «химические механизмы реакций и управление реакционной способностью, спиновая динамика и спиновая химия, экспериментальные методы исследования химической, энергетической и спиновой динамики» паспорта специальности 1.3.17 для физико-математической отрасли науки.

Диссертация «Динамика проникновения белка RL2 в клетки человека и открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин, по данным методов магнитного резонанса» соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (в текущей редакции), а ее автор, **Овчеренко Сергей Сергеевич**, заслуживает присуждения ему искомой ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 — «Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества».

Согласен на включение моих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Официальный оппонент:
доктор физико-математических наук,
заведующий лабораторией структурного
анализа биомакромолекул
ФГБУН «Федеральный исследовательский
центр «Казанский научный центр
Российской академии наук»



К.С. Усачев

6 сентября 2024 г.

Контактные данные:
тел.: 7(843)2927597, e-mail: k.usachev@knc.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.01.02 – Биофизика

Адрес места работы:
420111, Российская Федерация, Татарстан, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр
Российской академии наук», лаборатория структурного анализа
биомакромолекул
Тел.: 7(843)2927597; e-mail: k.usachev@knc.ru

Подпись	<i>Усачев К.С.</i>
ЗАВЕРЯЮ	
НАЧАЛЬНИК ОТДЕЛА ПРОТОКОЛА И ДЕЛОПРОИЗВОДСТВА	<i>Гаммаков Ф.И.</i>
« 6 »	сентября 2024 г.

