

ОТЗЫВ

официального оппонента к.ф.-м.н. Уварова Михаила Николаевича на диссертационную работу *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».

Диссертационная работа С.С. Овчеренко посвящена определению особенностей структуры и организации неупорядоченного белка RL2, являющегося рекомбинантным аналогом фрагмента человеческого к-казеина, в растворе, а также организации RL2 в клетках аденокарциномы легких человека A549. Также диссертационная работа посвящена характеристике процесса открытия–закрытия пар азотистых оснований, содержащих повреждение 8-оксо-7,8-дигидрогуанин.

Актуальность данной работы обусловлена малой изученностью белков с внутренней неупорядоченностью, несмотря на их широкую распространенность в клетках человека и вовлеченность в процессы развития онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Внутренне неупорядоченный белок RL2, который исследовался в данной работе, проявляет противоопухолевую активность и является основным компонентом противоопухолевого препарата Лактаптин, для которого завершены доклинические испытания. Актуальность изучения процессов открытия – закрытия пар азотистых оснований ДНК, содержащих повреждение 8-оксо-7,8-дигидрогуанин, обусловлена малой изученностью механизмов раннего распознавания ферментами репарации ДНК этого повреждения, которое приводит к дестабилизации ДНК и к возникновению мутаций, которые могут привести к развитию рака. При этом

позиционируется, что кинетика открытия-закрытия пар оснований может определять тип механизма раннего распознавания повреждения ферментами репарации ДНК.

Практическая значимость работы заключается в установлении более упорядоченных участков основной цепи RL2 и его остаточной третичной структуры в растворе, а также в установлении того, каким образом белок RL2 проникает в клетки человека. Эти результаты могут послужить основой для улучшения противоопухолевых свойств RL2 или при разработке лекарственных препаратов на основе этого белка. С другой стороны результаты по изучению процессов открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксо-7,8-дигидрогуанин, имеют существенное значение для понимания механизмов раннего распознавания этого повреждения гликозилазами ДНК.

Текст диссертационной работы изложен на 140 страницах, содержит 54 рисунка и 7 таблиц, а также список литературы, включающий 203 наименования.

Первая глава посвящена литературному обзору более 170 работ – монографий и статей - по теме диссертационной работы. В главе описано современное представление об исследованных внутренне неупорядоченных белках, их структурных особенностях, а также биологических процессах, в которых задействованы такие белки. Основной упор в литературном обзоре сделан на описание методик на основе спектроскопий ЯМР и ЭПР изучения динамики и остаточной структуры внутренне неупорядоченных белков. Отмечено, что наиболее информативным методом высокого разрешения для изучения внутренне неупорядоченных белков является метод ЯМР. Также в литературном обзоре изложено современное представление об окислительном повреждении ДНК, 8-оксо-7,8-дигидрогуанине, о его репарации ферментами репарации ДНК, а также о роли процесса открытия-закрытия пар азотистых оснований в узнавании повреждения 8-оксо-7,8-

дигидрогуанина ферментами репарации ДНК.

Во второй главе представлено описание полученных результатов и их обсуждение по изучению особенностей структуры, организации и молекулярной подвижности белка RL2 в растворе по данным методов спектроскопии магнитного резонанса: ЯМР и ЭПР. В частности, в этой главе обсуждаются полученные данные методов на основе ЯМР, характеризующие динамику основной цепи белка RL2, а также его остаточную третичную структуру в растворе. Кроме этого, во второй главе описаны результаты исследований механизма проникновения RL2 в клетки аденокарциномы легких человека по данным методов стационарной спектроскопии ЭПР и конфокальной микроскопии, а также данные стационарной спектроскопии ЭПР, характеризующие склонность RL2 образовывать мультимерные формы белка в процессе его проникновения в человеческие клетки.

В третьей главе изложена выполненная диссертантом адаптация методики CLEANEX-PM для измерения констант скорости обмена иминопотонов азотистых оснований в ДНК с протонами воды. В этой главе обсуждаются значения констант скоростей и равновесия процесса открытия-закрытия пар оснований, содержащих повреждение 8-оксо-7,8-дигидрогуанин, опирающиеся на данные ЯМР адаптированной методики CLEANEX-PM и формализм катализируемого протонного обмена. Сравниваются значения констант скоростей и равновесия открытия-закрытия пар оснований 8-оксо-7,8-дигидрогуанин – аденин, 8-оксо-7,8-дигидрогуанин – цитозин, гуанин – аденин, гуанин – цитозин, помещенные в разные нуклеотидные последовательности модельных дуплексов ДНК. Также приводятся и обсуждаются результаты плавления дуплексов ДНК, содержащих упомянутые выше пары оснований, на основании чего делается вывод о термической дестабилизации дуплексов ДНК из-за наличия поврежденных пар оснований, включающих 8-оксо-7,8-дигидрогуанин.

*

Результаты диссертационной работы опубликованы в международных журналах «Journal of American Chemical Society» и «Molecules», и успешно апробированы на международных и всероссийских научных конференциях.

Текст диссертационной работы написан понятным языком, на высоком научном уровне, достоверность представленных результатов не вызывает никаких сомнений, однако, при прочтении текста работы возникли следующие незначительные замечания.

1. Одной из задач работы было поставлено «Получить кривые плавления исследуемых дуплексов ДНК, <...>» (стр.10). Понятие «Кривые плавления» является неоднозначным, поэтому следует сформулировать эту исследовательскую задачу другими словами, избегая таких слов.
2. В обсуждении полученных спектров ЭПР спин-меченного белка RL2 в культуральной среде DMEM, утверждается, что «белок почти полностью переходит в агрегированное состояние» (стр. 73), однако, не указываются параметры спектров, достоверно соответствующих ЭПР-спектру агрегата. Таким образом, в работе не хватает обсуждения о том, почему белок RL2 проникает в клетку в виде агрегатов.
3. К сожалению, в работе не обсуждается проблема воспроизводимости экспериментов по изменению интенсивностей ЭПР-спектров в живых клетках вследствие процессов метаболизма. В частности, не ясно, насколько воспроизводимы кинетики, представленные на рис. 2.22, и какова природа излома кинетики на рис. 2.22 А.

Эти замечания являются несущественными, и диссертационная работа *«Динамика проникновения белка RL2 в клетки человека и открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин, по данным методов магнитного резонанса»* полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе отвечает критериям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в текущей редакции), а её автор *Овчеренко Сергей Сергеевич* заслуживает присуждения учёной 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:

Кандидат физико-математических наук (специальность 01.04.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества), старший научный сотрудник лаборатории Химии и физики свободных радикалов ФГБУН Институт химической кинетики и горения им.

В.В.Воеводского СО РАН,

Уваров Михаил Николаевич



Подпись

Контактные данные:

тел.: +73833331377, e-mail: uvarov@kinetics.nsc.ru

ФГБУН Институт химической кинетики и горения

им. В.В.Воеводского СО РАН.

Ул. Институтская, 3, 630090,

г. Новосибирск

Дата « 30 » сентября 2024 г.

Подпись к.ф.-м.н. М.Н. Уварова удостоверяю



Заместитель директора
ИХКГ СО РАН
по научной работе, к.х.н.
Валиулин С.В.