

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения науки Институт
«Международный томографический центр» Сибирского
отделения Российской академии наук

Профессор РАН, д.ф.-м.н. Федин М.В.



М.В. Федин

30 сентября 2024

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук 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.

Актуальность темы диссертации заключается в изучении свойств внутренне неупорядоченных белков (ВНБ) и их роли в биологических процессах, связанных с развитием различных заболеваний, включая онкологические и нейродегенеративные патологии. Белки с внутренней неупорядоченностью, такие как изучаемый в работе белок RL2, участвуют в передаче сигналов и регуляции внутри клеток, а также способны специфически связываться с различными молекулами-мишенями, что делает их перспективными для разработки лекарственных препаратов. В то же время, повреждения ДНК, такие как образование 8-оксогуанина, приводят к генетической нестабильности и могут привести к развитию рака. В данной работе используются методы магнитного резонанса (ЭПР и ЯМР), позволяющие на молекулярном уровне исследовать структуру, динамику и взаимодействия RL2, а также механизм распознавания и репарации повреждений ДНК. Изучение динамики проникновения белка RL2 в клетки человека и особенностей механизма распознавания поврежденных участков ДНК гликозилазами создаст основы для разработки новых противоопухолевых препаратов и методов терапии. **Теоретическая значимость** работы заключается в углублении знаний о свойствах внутренне неупорядоченных белков (IDP) и механизмах их взаимодействия с молекулами-мишенями, а также в понимании динамики процесса распознавания и репарации повреждений ДНК, таких как 8-оксогуанин. Полученные данные о структуре и поведении белка RL2, а также о кинетике открытия-закрытия пар оснований ДНК, дополняют существующие фундаментальные представления о клеточных механизмах регуляции, сигнализации и поддержания геномной стабильности. Использование методов ЭПР и ЯМР позволило провести детальный анализ динамических процессов на молекулярном уровне, что является ценным

вкладом в область биофизики и биохимии. **Практическая значимость** работы состоит в том, что результаты исследования могут стать основой для разработки новых противоопухолевых препаратов на основе белка RL2, а также для совершенствования методов доставки биологически активных молекул в клетки. Разработанные методики и протоколы проведения экспериментов (включая адаптацию методов ЭПР и ЯМР для изучения динамики белков и ДНК) могут быть применены в дальнейших исследованиях других биомолекул и их взаимодействий в живых системах. **Научная новизна** исследований заключается в комплексном изучении внутренне неупорядоченного белка RL2 и динамики распознавания повреждений ДНК с использованием методов ЭПР и ЯМР. Впервые было показано, что N-концевой участок RL2, ответственный за его цитотоксическую активность, обладает повышенной упорядоченностью и участвует в формировании остаточной третичной структуры. Установлено, что проникновение RL2 в клетки происходит преимущественно в агрегированном состоянии, и что клетки аденокарциномы лёгких способны накапливать этот белок, что открывает новые возможности для разработки противоопухолевых препаратов. Также впервые была адаптирована методика CLEANEX-PM для измерения кинетики обмена иминопротонов ДНК, что позволило определить параметры открытия-закрытия пар оснований, содержащих 8-оксогуанин. Получены новые данные о кинетических константах для пар 8-оксогуанин – аденин (охоG:A) и 8-оксогуанин – цитозин (охоG:C) и о влиянии нуклеотидной последовательности на их динамику, что важно для понимания механизмов распознавания повреждений ДНК гликозилазами. **Достоверность** представленных в диссертационной работе результатов и заключений обусловлена использованием современных экспериментальных подходов и тщательной методологии исследования, воспроизводимостью научных результатов и их согласием с литературными данными. Полученные результаты апробированы на ряде российских и международных конференций, таких как ISMAR EUROMAR JOINT CONFERENCE 2019 (Германия, 2019), 2022 International Voevodsky Conference: Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes (Новосибирск, 2022), International Conference "Magnetic Resonance - Current State and Future Perspectives" (Казань, 2019), Современные проблемы органической химии СПОХ-2023 (Новосибирск, 2023) и другие. Основные материалы работы опубликованы в 3 статьях рецензируемых зарубежных научных журналов, в том числе таких высокорейтинговых как Journal of the American Chemical Society.

Методология данного исследования основывается на комплексном применении методов магнитного резонанса и молекулярной биофизики для изучения структуры и поведения внутренне неупорядоченного белка RL2, а также динамики повреждений в ДНК. Для исследования структуры и организации белка RL2 в растворе применялись методы стационарного электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и двойного электрон-электронного резонанса (ДЭЭР). Дополнительно были проведены двумерные и трёхмерные импульсные эксперименты ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах ^1H , ^{13}C и ^{15}N , а также использовался метод парамагнитного усиления релаксации. Для исследования поведения RL2 в клетках человека проводились эксперименты стационарного ЭПР и конфокальной микроскопии, что позволило определить состояние белка внутри клеточной среды. Изучение динамики открытия и закрытия пар оснований ДНК осуществлялось с помощью методологии катализируемого протонного обмена, измерялись константы скорости обмена иминопротонов с протонами воды, используя адаптированный протокол ЯМР (CLEANEX-PM). Дополнительно для определения термодинамических параметров плавления ДНК-дуплексов и идентификации сигналов ^1H иминопротонов проводились одномерные и двумерные ЯМР эксперименты. Такой

комплексный подход позволил глубоко исследовать структурные особенности и динамические свойства белка RL2, а также механизмы распознавания повреждений в ДНК.

Введение диссертационной работы обосновывает актуальность темы исследования и степень ее проработанности, формулирует цель и задачи работы, а также описывает научную новизну и практическое значение результатов. Кроме того, введение отражает личный вклад автора, также во введении характеризуется степень достоверности полученных результатов.

Целью данной работы является изучение процессов, протекающих с белком RL2 при его нахождении в растворе и в живых клетках человека, а также определение параметров динамики процесса открытия-закрытия пар оснований ДНК, содержащих повреждение 8-оксогуанин

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Определить динамику основной цепи RL2 и выявить более упорядоченные участки основной цепи белка с помощью ^{15}N релаксационных экспериментов ЯМР. Получить данные об остаточной структуре RL2 в растворе с помощью метода парамагнитного усиления релаксации. Соотнести получаемые результаты ЯМР с соответствующими формами RL2 – димером и мономером.
- 2) Разработать методику проведения экспериментов ЭПР на живых клетках человека и исследовать поведение белка RL2 в клетках аденокарциномы легких человека A549 в процессе его проникновения.
- 3) Адаптировать подход CLEANEX-PM для измерения констант скорости обмена k_{ex} иминопротонов с протонами воды. Применить полученный протокол CLEANEX-PM и при разных концентрациях добавляемого внешнего акцептора протонов измерить значения k_{ex} иминопротонов для набора дуплексов ДНК, содержащих пары оснований G:A, G:C, охoG:A и охoG:C. Обработать полученные данные, применяя формализм катализируемого протонного обмена, и получить кинетические параметры процесса открытия-закрытия исследуемых пар оснований.
- 4) Получить кривые плавления исследуемых дуплексов ДНК, извлечь термодинамические параметры плавления и установить влияние наличия пар с 8-оксогуанином на стабильность дуплексов ДНК.

Глава 1 посвящена литературному обзору. В ней рассмотрены история и свойства внутренне неупорядоченных белков, в том числе подкласса казеинов, а также объект исследования – белок RL2. Описаны методы изучения этих белков с использованием спектроскопии ЯМР и ЭПР, структура и свойства 8-оксогуанина - повреждения ДНК, ферменты репарации ДНК и механизмы распознавания повреждений. Также изложена методология катализируемого протонного обмена для определения констант скоростей и равновесия процесса открытия-закрытия пар оснований ДНК.

Глава 2 посвящена исследованию структуры и организации белка RL2 в растворе с помощью методов магнитного резонанса, а также изучению поведения RL2 в клетках аденокарциномы легких человека A549 при его проникновении. В этой главе методом ЭПР изучалась склонность белка RL2 к агрегации в растворе при различных значениях pH, проводились ^{15}N релаксационные измерения методом ЯМР для определения упорядоченных участков белка, а также применялась методика парамагнитного усиления релаксации для выявления наличия остаточной третичной структуры. Для изучения поведения RL2 в клетках

использовались стационарный ЭПР и конфокальная микроскопия, что позволило оценить эффективность проникновения белка в клетки, его агрегацию и возможное накопление. Кроме того, изучалось влияние компонентов среды инкубирования и ингибиторов эндоцитоза на проникновение RL2 в клетки, а также кинетика изменений в организации белка после попадания в клеточную среду.

Глава 3 посвящена определению констант скоростей и равновесия процесса открытия-закрытия пар оснований ДНК, содержащих повреждение 8-оксогуанин. Для пар G:A, G:C, oхoG:A и oхoG:C были измерены константы скорости обмена иминопотонов ДНК с протонами воды при разной концентрации протонного акцептора. На основе этих данных были рассчитаны параметры кинетики и равновесия открытия-закрытия пар оснований. Установлено, что пары oхoG:C характеризуются большей стабильностью, чем G:C, в то время как равновесие в парах oхoG:A сильно смещено в сторону открытого состояния. Также исследовано влияние 8-оксогуанина на термическую стабильность ДНК-дуплексов и показано, что наличие oхoG:A приводит к значительной дестабилизации дуплексов.

Текст диссертационной работы завершается основными результатами и выводами, списком сокращений и условных обозначений, списком цитируемой литературы, содержащим 203 источника, по большей части представленных статьями в современных зарубежных журналах в области биохимии и химической физики, и приложения с таблицами и рисунками.

Материалы работы представлены достаточно подробно; приведение данных в виде разнообразных таблиц и рисунков помогает восприятию полученных результатов. Материал диссертации изложен хорошим, понятным языком. Личный вклад автора не вызывает сомнений. Автореферат в достаточной степени передает содержание диссертационной работы.

При прочтении текста диссертационной работы возникли следующие вопросы и замечания:

- 1) В тексте диссертации, как правило, используются англоязычные аббревиатуры, в том числе для метода импульсной спектроскопии ЭПР, разработанного в институте Химической кинетики и горения СО РАН. Текст диссертации мог выглядеть более лаконично при использовании русскоязычных аббревиатур в тех случаях, где это возможно.
- 2) Описывая модифицированный протокол CLEANEX_{PM}, автор указывает на включение в протокол блока последовательностей, позволяющего «учесть компенсацию неравного нагрева образца за счет разной длительности спин-лока, что позволило улучшить качество извлекаемых данных» (стр. 87 диссертационной работы). О каких характерных величинах температурного нагрева образца идет речь? Что является наиболее критичным следствием изменения температуры образца в процессе эксперимента: изменение заселенности спиновых уровней, различия во временах спиновой релаксации, возникающие неоднородности магнитного поля B_0 , вызванные изменением температуры образца, или что-то еще?
- 3) На рисунке 2.22 представлена кинетика интегральной интенсивности спектров ЭПР для образцов клеток A549 после их инкубации в культуральной среде с sRL2. Какой процесс пробоподготовки принимается за нулевую точку отсчета времени? Почему запись кинетики начинается только спустя один час? Можно ли как-то модифицировать процесс пробоподготовки с целью сокращения этого времени? На кинетике, представленной на рисунке 2.22(A), отчетливо наблюдается смена угла наклона кривых после 11 часов эксперимента. Чем вызвана данная особенность?

Указанные замечания не снижают общей положительной оценки диссертационной работы и во многом носят дискуссионный характер. Содержание диссертации и автореферата соответствуют паспорту специальности 1.3.17. «Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества» в части пункта 1 «химическая и спиновая динамика элементарных процессов, экспериментальные методы исследования структуры и динамики химических превращений» и в части пункта 5 «химические механизмы реакций и управление реакционной способностью, спиновая динамика и спиновая химия, экспериментальные методы исследования химической, энергетической и спиновой динамики».

Отзыв 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» заслушан и утвержден на общеполитическом научном семинаре МТЦ СО РАН 10 сентября 2024 (Протокол № 6, от 10 сентября 2024г.)

Диссертационная работа Овчеренко Сергея Сергеевича на тему «Динамика проникновения белка RL2 в клетки человека и открытия-закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин, по данным методов магнитного резонанса» является цельным законченным исследованием, содержит достоверные новые результаты, по своей новизне, актуальности, практической и теоретической значимости соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени физико-математических наук, а ее автор, С.С. Овчеренко, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Отзыв подготовил:

Доктор физико-математических наук по специальности 1.4.4 — физическая химия, ведущий научный сотрудник Лаборатории ЭПР спектроскопии МТЦ СО РАН



С. Л. Вебер

Контактные данные

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3а

Сайт: <https://www.tomo.nsc.ru/>

Телефон: +7 (383) 333-14-48

Адрес электронной почты: itc@tomo.nsc.ru



Подпись С. Л. Вебера

авторство

Ученый секретарь

МТЦ СО РАН

С. С. Романович

30.09.2024

С. Л.