

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Савицкой Виктории Юрьевны
на тему: «Особенности взаимодействия белков систем эксцизионной
репарации ДНК с GC-богатыми фрагментами регуляторных областей генома
эукариот и прокариот»
по специальности 1.4.9. Биорганическая химия

Актуальность темы диссертации

Поддержание стабильности генома является одной из ключевых задач систем репарации ДНК, обеспечивающих нормальное функционирование как прокариотических, так и эукариотических организмов. Особый интерес в последние годы вызывает изучение GC-богатых участков генома, обладающих повышенной склонностью к образованию неканонических вторичных структур ДНК, в частности G-квадруплексов (G4). Эти структуры рассматриваются как важные регуляторные элементы, влияющие на процессы транскрипции, репликации и репарации ДНК. При этом остается недостаточно изученным вопрос о том, каким образом наличие GC-богатого контекста и формирование G4-структур влияет на функционирование белков систем репарации ДНК.

Диссертационная работа Савицкой В.Ю. посвящена исследованию взаимодействия ключевых белков систем репарации ДНК (MMR прокариот и BER эукариот) с GC-богатыми последовательностями и образуемыми ими G-квадруплексными структурами. Работа направлена на решение актуальной научной проблемы, связанной с выяснением причин повышенного мутагенного потенциала GC-богатых областей генома и ограничений эффективности репарации в этих регионах.

Автором сформулирована конкретная цель: биохимическая характеристика взаимодействия ключевых белков систем репарации MMR прокариот и BER человека с GC-богатыми последовательностями и образуемыми ими G-квадруплексными структурами *in vitro* на примере регуляторных областей генов *pilE* и *hTERT*.

Таким образом, тема диссертации является современной, актуальной и имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Краткая характеристика содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционной структуре и включает введение, обзор литературы, разделы «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключение, выводы и список литературы.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, определены объект и предмет исследования, приведены положения, выносимые на защиту, а также отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Обзор литературы содержит подробный анализ современных представлений о механизмах репарации ДНК (BER, NER, MMR), их роли в поддержании стабильности генома, а также рассмотрена альтернативная роль: в патогенезе прокариот, в онкогенезе и поддержании генетического разнообразия в клетках человека. Обзор литературы содержит данные о влиянии GC-богатых последовательностей и G-квадруплексных структур на функционирование некоторых белков, тем не менее, многие аспекты остаются невыясненными, что еще раз подчеркивает актуальность исследования.

В разделе «Материалы и методы» приведено подробное описание использованных в работе экспериментальных подходов. Автором представлены сведения о получении и очистке рекомбинантных белков, подготовке модельных ДНК-субстратов, а также условиях проведения биохимических и биофизических экспериментов. Описаны методы анализа ДНК-белковых взаимодействий, включая EMSA и интерферометрию биослоя. Подробно описаны модели, используемые автором для анализа комплексообразования изучаемых белков с модельными ДНК. Для изучения ферментативной активности белков использованы электрофоретические методы в денатурирующих условиях с последующей количественной оценкой продуктов реакции. Структурные характеристики ДНК,

включая формирование G-квадруплексных структур, исследованы с применением спектральных методов, таких как спектроскопия кругового дихроизма и УФ-спектроскопия. Также приведено описание методов биоинформатического анализа геномных последовательностей. В целом, использованные методы являются современными, адекватными поставленным задачам и обеспечивают достоверность полученных результатов.

Раздел «Результаты и обсуждение» содержит основные экспериментальные данные работы и выводы по ним. Автором проведено комплексное исследование функционирования белков MutL и MutS системы MMR прокариот в условиях GC-богатого окружения и при наличии G-квадруплексных структур. Показано, что MutL *N. gonorrhoeae* обладает повышенным сродством к G4, однако его эндонуклеазная активность ограничена в пределах G-квадруплексного мотива. Установлено, что MutS *C. sphaeroides* неэффективно распознает «мисматч» в GC-богатом контексте. Во второй части работы исследовано влияние GC-богатых последовательностей промотора гена *hTERT* человека на функционирование фермента APE1 системы BER. Спектральными методами подтверждено формирование G-квадруплексной структуры 68-звенным G-богатым фрагментом матричной цепи промотора *hTERT*. Для изучения активности APE1 человека были созданы одноцепочечные и двуцепочечные 96-звенные модельные ДНК на основе 68-звенного G-богатого фрагмента промотора *hTERT* с заменой/ами G→F в матричной цепи или C→F в кодирующей цепи (F - 1,2-дидезоксирибоза - стабильный аналог AP-сайта) в позициях, соответствующих «драйверным» мутациям. Показано, что G→F снижает термическую стабильность и влияет на топологию G4. В целом, наличие G4-структур снижает эффективность гидролиза ДНК, содержащей AP-сайты, белком APE1. Полученные результаты обсуждаются в контексте современных литературных данных.

Степень обоснованности положений, выносимых на защиту

Каждое из сформулированных положений базируется на данных экспериментов, полученных с использованием независимых и взаимодополняющих

методов. Положение о специфическом взаимодействии белка MutL с G-квадруплексными структурами подтверждается результатами анализа ДНК-связывающей и каталитической активностей. Вывод о снижении эффективности распознавания «мисматча» белком MutS в GC-богатом окружении основан на сравнительном анализе его ДНК-связывающей способности к субстратам различного нуклеотидного состава. Положения, касающиеся влияния G-квадруплексных структур промотора *hTERT* на функционирование фермента APE1, обоснованы результатами спектрального анализа структуры ДНК и данными по эффективности связывания и гидролиза модельных субстратов.

Таким образом, все положения, выносимые на защиту, логически вытекают из представленных экспериментальных данных, согласуются между собой и не противоречат современным представлениям в области молекулярной биологии и биоорганической химии.

Степень обоснованности и достоверности результатов

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается использованием широкого спектра современных экспериментальных методов, адекватных поставленным задачам, а также значительным объемом полученных данных. Выводы диссертации логически вытекают из представленных результатов, согласуются между собой и соответствуют поставленным целям исследования. Экспериментальные данные воспроизводимы и подтверждаются использованием различных методических подходов. Результаты работы апробированы на научных конференциях и опубликованы в рецензируемых научных журналах, что также свидетельствует об их достоверности.

Научная новизна исследования

В диссертационной работе получен ряд новых научных результатов, имеющих существенное значение для развития представлений о функционировании систем репарации ДНК:

– впервые показано, что белок MutL из системы MMR *Neisseria gonorrhoeae* обладает повышенным сродством к G-квадруплексным структурам, при этом его эндонуклеазная активность подавлена в пределах G4-мотива;

– установлено, что белок MutS неэффективно распознает неканонические пары нуклеотидов в GC-богатом окружении, что свидетельствует о роли таких участков как ограничивающего фактора для MMR;

– продемонстрировано, что G-квадруплексные структуры, формируемые матричной цепью промотора гена *hTERT*, снижают эффективность функционирования фермента APE1;

– предложена гипотеза о возможном молекулярном механизме закрепления «драйверных» мутаций в GC-богатых регуляторных областях генома.

Научная и практическая значимость работы

Полученные результаты существенно расширяют существующие представления о молекулярных механизмах функционирования систем репарации ДНК в сложных структурных контекстах. Работа имеет фундаментальное значение для понимания причин повышенного мутагенного потенциала GC-богатых областей генома, а также роли неканонических структур ДНК в регуляции репарации.

Замечания и вопросы

Несмотря на высокое качество выполненной работы, диссертация содержит ряд замечаний:

- Почему не отщепляли His последовательности в рекомбинантных белках?
- Эксклюзионная хроматография – русский термин гель-фильтрация.
- В автореферате «Структурные особенности модельных ДНК» - не приведены рисунки.

- «содержащими и несодержащими» - здесь и во многих местах орфографические ошибки.

- Рисунок 5 – лэддер неподходящий, нет возможности точно определить длины. Почему авторы заявляют об отсутствии специфичности гидролитического

расщепления? Расщепление каждый раз разное? Или все же расщепление идет постоянно по одним и тем же участкам с формированием «дорожки»?

- Множество англицизмов: эксклюзионный, мисматч.

- Почему показаны именно эти отряды млекопитающих? Не ключевые отряды, которые включают грызунов, хищных, рукокрылых, китопарнокопытных, хоботных, насекомоядных и зайцеобразных. Почему было также не посмотреть однопроходных, сумчатых, непарнокопытных?

- На рисунке 2 автореферата не приведена дорожка с референсными молекулярными массами.

- Диссертантом исследовано влияние GC-богатых последовательностей на эффективность эксцизионной репарации. Между тем, GC являются мишенями для ДНК-метилирования, поэтому вместе с нуклеотидным составом логично было бы оценить репарацию на метилированных матрицах в тестах *in vitro* и на клеточных моделях. Аналогичное замечание относится и к опытам по оценке влияния F-сайтов в G-богатой цепи на структуру ДНК.

- Результаты представлены в работе как качественные характеристики, в то время как обсуждаются отличия между различными экспериментальными условиями, что требует статистической обработки результатов и пояснений о статистической значимости выявленных отличий

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общей высокой оценки работы.

Заключение

Диссертационная работа Савицкой Виктории Юрьевны является завершенным научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком научном уровне и содержащим новые результаты, имеющие существенное значение для развития биоорганической химии и молекулярной биологии.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.9. Биоорганическая

химия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Савицкая Виктория Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук

заведующий кафедрой биотехнологии Института фармации им. А.П. Нелюбина Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

КОСТЮШЕВ Дмитрий Сергеевич

15.04.2026 г.

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.10 – Вирусология

Адрес места работы:

119571, г. Москва, проспект Вернадского, д. 96, корпус 1

СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, Институт фармации им. А.П. Нелюбина

Подпись Д.С. Костюшева заверяю: