

**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 G-богатыми фрагментами регуляторных областей
генома эукариот и прокариот»
по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия**

Образование «мисматчей», модифицированных азотистых оснований, апуриновых/апиримидиновых (AP) сайтов и разрывов цепей ДНК – это спектр процессов, которые приводят к повреждению структуры ДНК и ускорению мутагенных процессов, вплоть до гибели клетки или возникновения различных заболеваний. Для предотвращения негативных эффектов этих процессов в клетках всех живых организмов имеется несколько систем репарации. На основании ключевых участников выделяют несколько путей репарации ДНК: эксцизионная репарация оснований (BER) отвечает за поиск в ДНК, распознавание и удаление необъемных повреждений азотистых оснований, например, окисленные и алкилированные азотистые основания, урацил в ДНК, AP-сайты; эксцизионная репарация нуклеотидов отвечает за репарацию объемных повреждений ДНК, таких как пиримидиновые димеры, аддукты азотистых оснований с ароматическими соединениями; репарация мисматчей (MMR) распознает и удаляет неправильно спаренные азотистые основания; гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов отвечает за удаление двойных разрывов ДНК.

Процесс удаления повреждений ДНК изучался на протяжении многих лет и в настоящее время известны многие детали функционирования ферментов репарации ДНК. Однако, большинство исследований механизмов действия ферментов систем репарации ДНК проводились ранее и проводятся в настоящее время с использованием модельных двуцепочечных ДНК-субстратов, обычно формирующих дуплекс В-формы.

При этом известно, что некоторые последовательности ДНК способны принимать альтернативные конформации, которые отличаются от канонической В-формы. Такие структуры часто объединяют общим термином - «не-В»-конформациями ДНК (Non-B form DNA conformations). Описано несколько типов «не-В»-конформаций ДНК, среди которых можно отметить структуры со смещением (slipped structures), шпильчатые и крестообразные структуры, трехспиральные «триплексные» структуры, стабильные G4-квадруплексные структуры.

Безусловно, структура ДНК должна оказывать существенное влияние на эффективность работы систем репарации. Поэтому в настоящее время актуальным является изучение действия ферментов репарации в случае ДНК-субстратов, формирующих сложную пространственную структуру. В связи со значительным влиянием квадруплексных структур в промоторных областях на эффективность транскрипции исследование особенностей репарации повреждений ДНК в их составе имеет фундаментальное значение, а полученные результаты могут не только расширить фундаментальные представления о работе систем репарации, но и предложить новые подходы к направленной модуляции этих процессов. В связи с этим можно заключить, что диссертационная работа Виктории Юрьевны, направленная на детальное исследование функционала некоторых белков-участников BER и MMR в контексте GC-богатых последовательностей и G4-структур, своевременна и полностью обоснована.

В целом диссертационная работа Виктории Юрьевны посвящена выявлению специфических молекулярных особенностей взаимодействия белков-участников BER и MMR с неканоническими элементами ДНК и определения факторов, лимитирующих эффективность репарации в таких участках.

На пути достижения основной цели Виктория Юрьевна выполнила систематическое исследование, включающее пять взаимосвязанных задач, а

именно: 1) установила влияние G-квадруплекса, потенциально формирующегося регуляторной G-богатой последовательностью перед геном *pilE*, на функционирование *in vitro* MutL *Neisseria gonorrhoeae*; 2) охарактеризовала способность белка MutS *Cereibacter sphaeroides* узнавать неканоническую пару нуклеотидов в GC-богатой (82%) последовательности ДНК; 3) выявила эволюционную консервативность G4-мотивов G-богатой области промотора генов обратной транскриптазы теломеразы (*TERT*) млекопитающих; 4) подтвердила формирование G-квадруплексной структуры *in vitro* в 68-звенном G-богатом участке промотора *TERT* человека и установила влияние стабильного аналога AP-сайта в положениях, соответствующих «драйверным» мутациям, на стабильность G4; 5) охарактеризовала эффективность связывания и гидролиза ферментом APE1 человека модельных одно-и двуцепочечных фрагментов ДНК, содержащих 68-звенную G-богатую последовательность промотора *hTERT* с одним или двумя аналогами AP-сайта, локализованными в положениях, соответствующих «драйверным» мутациям. Положения, выносимые на защиту, соответствуют цели и задачам исследования и полностью обоснованы.

Полученные в данном исследовании результаты позволяют на новом уровне понять то, как системы поддержания геномной стабильности могут быть одновременно защитным и регуляторным факторами. В целом данная диссертационная работа включает два больших блока исследований, посвященных особенностям репарации прокариот и эукариот. Так, в рамках первой части исследования показано, что один из ключевых белков системы MMR, а именно фермент MutL из *Neisseria gonorrhoeae*, способен специфически связываться с G-квадруплексами в регуляторных областях генома *Neisseria gonorrhoeae*, а именно с параллельным G4 перед геном *pilE*, необходимым для инициации антигенной вариации гена белка пилина. Установлено, что сродство MutL к G4 заметно выше, тогда как гидролиз

фосфодиэфирных связей MutL происходит до и после, но не внутри G4. При этом второй важный участник пути MMR - MutS из *Cereibacter sphaeroides*, неспособен узнавать «мисматч» в GC-богатом регионе дуплексной ДНК. Таким образом, совокупность полученных результатов с одной стороны подтверждает высокий мутагенный потенциал GC-богатых участков и регионов формирующих G4-квадруплексы, а с другой стороны позволяет предположить, что антигенная вариация *pile* *Neisseria gonorrhoeae* регулируется белком MutL путем связывания с G4. Вторая часть диссертации посвящена выявлению причинно-следственных связей закрепления «драйверных» мутаций в промоторе гена обратной транскриптазы теломеразы человека *hTERT*, а также особенностей действия ключевого фермента BER - апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека APE1 в GC-богатом контексте ДНК. Поскольку G4-образующие последовательности встречаются в промоторах онкогенов, мутации в которых часто коррелируют с развитием онкологических заболеваний и в качестве примера в данном исследовании был выбран промотор *hTERT* - фермента, активного в стволовых, половых и раковых клетках, поддерживающего длину теломерных повторов. Полученные данные показывают, что AP-сайты в G-богатой (некодирующей) цепи промотора *hTERT* снижают термическую стабильность G4, тогда как эти же модификации в некоторых положениях комплементарной кодирующей C-цепи, наоборот, могут стабилизировать G-квадруплексы в противоположной цепи. Установлено, что в условиях образования G4-структур эффективность действия APE1 человека при удалении AP-сайта протекает менее эффективно, что позволило сделать заключение о том, закрепление «драйверных» мутаций в GC-богатом регионе промотора *hTERT* может быть результатом дисфункции APE1.

Представленная работа написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 127 страницах и содержит 46 рисунков и 13 таблицы. Библиография включает 214 литературных источников.

Обзор литературы включает описание путей репарации ДНК и их роль как в адаптации и изменчивости *Neisseria gonorrhoeae*, так и в поддержании генетической информации в клетках человека.

Экспериментальная часть работы достаточно полно описывает теоретические и экспериментальные подходы использованные при проведении биоинформатического анализа, а также содержит все условия проведенных экспериментов.

Многообразие использованных подходов исследования и экспериментальных методов позволило соискателю разделить полученные результаты на несколько частей, каждая которых послужила основанием для выводов диссертационной работы. Все полученные результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. Выводы диссертационной работы корректны и полностью обоснованы полученным экспериментальным материалом.

Работа опубликована в 6 научных статьях в отечественных и зарубежных журналах в области молекулярной биологии и биохимии. Материалы работы также были представлены на международных и российских конференциях.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работ по данному вопросу.

По написанию диссертации имеется несколько замечаний.

1) Суммируя результаты работы сделано заключение о том, что AP-сайты в G-богатой (замены G→F) цепи промотора *hTERT* снижают термическую стабильность G4, тогда как эти же модификации в некоторых положениях комплементарной кодирующей C-цепи (замены C→F), наоборот, могут стабилизировать G-квадруплексы в противоположной цепи. Это заключение сделано на основании сравнения температур плавления укороченных квадруплексов, несущих замены G→F и данных об эффективности расщепления структур, содержащих замены C→F, с помощью APE1. В связи этим возникает вопрос почему не были получены профили плавления полноразмерных фрагментов, несущих данные замены. Вероятно, это не позволило бы точно рассчитать температуру плавления в следствие сложноструктурированного субстрата. Однако такие данные на качественном уровне верифицировали бы предположение, основанное на сравнении совершенно разных способов «оценки» стабильности квадруплексной части использованных сложноструктурированных субстратов.

2) В тексте диссертации упоминается, что эффективность действия ферментов репарации в отношении ДНК-субстратов, формирующих G-квадруплексы, значительно зависит от топологии квадруплексной структуры (параллельная, антипараллельная, гибридная конфигурация). При этом показано, что введение тетрагидрофуранового аналога AP-сайта в некоторые положения квадруплекса может индуцировать перестройку топологии. В связи с этим возникает вопрос - можно ли обобщить предположение о причинах закрепления «драйверных» мутаций в промоторе гена обратной транскриптазы теломеразы человека *hTERT*, на промоторы других генов, способных формировать квадруплексы с другим типом топологии?

3) Термическая стабильность ряда G-квадруплексов, содержащих AP-сайт или его аналог в различных положениях коровой части и/или петлях достаточно хорошо описана в литературе. Насколько основное заключение,

полученное в рамках данного блока работы, а именно замены «G→F в G-трактах центрального ²G4 *hTERT* промотора не разрушают структуру квадруплекса полностью, но оказывают дестабилизирующее влияние, которое зависит от положения модификации» согласуется с литературными данными и были ли выявлены особенности термической стабильности ²G4-квадруплекса?

В целом необходимо отметить, что текст диссертации написан хорошим русским языком, а имеющиеся в работе единичные мелкие опечатки, неудачные формулировки, конечно, не носят принципиального характера и не влияют на общую высокую научную значимость полученных автором результатов и сформулированных выводов.

Подводя итог, необходимо отметить, что, без сомнения, результаты работы служат важнейшим шагом к дальнейшему изучению биологической роли белка *hTERT*, образующегося в результате трансляции теломеразной РНК. Данные, полученные в работе, представляют значительную ценность для биоорганической химии, молекулярной биологии, биохимии и смежных наук.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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 химических наук, чл.-корр. РАН
заведующий лабораторией генетических технологий
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»

Кузнецов Никита Александрович

14.04.2026

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.01.04 – Биохимия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 8
ФГБУН «ИХБФМ СО РАН», лаборатория генетических технологий
Тел.: 8 (383) 363-51-75; e-mail: nikita.kuznetsov@1bio.ru

Подпись сотрудника
ИХБФМ СО РАН Н.А. Кузнецова удостоверяю::