

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

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ. Диссертационное исследование направлено на прояснение одного из аспектов поддержания стабильности генома, а именно работы системы репарации в G/C-богатых участках генома. Окисление остатков гуанозина и дезаминирование остатков цитозина создает потенциал для накопления мутаций в таких участках. Своевременная эксцизия окисленных или дезаминированных оснований гликозилазами с образованием AP-сайтов и активность AP-эндонуклеазы в рамках BER-репарации обеспечивают сохранность G/C-богатых участков. Механизм данного процесса относительно полно описан в контексте В-формы ДНК. Однако, при организации G/C-сайтов в последовательные G/C-тракты возможно формирование альтернативных (неканонических) вторичных структур – гуаниновых квадруплексов (G4). Очевидно, что это вносит коррективы в распознавание повреждений ферментами системы BER, но вопрос изучен слабо. Кроме того, само формирование G4 на стадии репликации является дополнительным источником повреждений и ошибок спаривания (мисматчей), накопление которых предотвращает система MMR. Выявление особенностей работы MMR и BER в G/C-богатых областях в целом и G4 в частности – своевременная задача ввиду признания последних перспективными терапевтическими мишенями. Находящиеся в разработке антибактериальные и противоопухолевые агенты включают лиганды к G4 в цис-регуляторах генов вирулентности прокариот и (прото)онкогенов эукариот соответственно. Рационализация стратегий тестирования и применения таких агентов требует понимания взаимовлияния G4-фолдинга и репарации, что определяет актуальность темы исследования.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

Высокая практическая значимость исследования обусловлена тем, что для прояснения фундаментальных аспектов репарации G/C-богатых участков диссертантом выбраны регуляторные области генов с подтвержденным вкладом в патогенез. Речь идет о гене *hTERT*, кодирующем обратную транскриптазу – каталитический компонент теломеразы человека, и гене *N. gonorrhoeae pilE*, кодирующем пилин – фактор вирулентности, отвечающий за адгезию на эндотелиальных клетках хозяина. Теломераза обеспечивает поддержание пролиферативного потенциала раковых клеток; активации ее экспрессии способствуют «драйверные» мутации –нерепарированные замены в G/C-богатом участке промотора, которые повышают его сродство к активирующему транскрипционному фактору. Прояснение механизма закрепления драйверных мутаций позволит, как минимум, уточнить оценку риска онкогенеза. В диссертационной работе рассмотрены и частично подтверждены 2 вероятных пути закрепления мутаций, а именно (i) за счет сниженной способности ферментов BER исправлять повреждения непосредственно в G4; (ii) за счет удержания ферментов на G4 при возникновении повреждения в противоположащей цепи. Первый вариант продемонстрирован для AP-эндонуклеазы (APE1) впервые и согласуется с показанным ранее сходных эффектом для гликозилазы OGG1. Второй вариант позволяет интерпретировать G4 как своего рода ловушки на ферменты репарации; эта версия отличается оригинальностью и, в то же время, перекликается с установленным ранее секвестированием ферментов других систем (ДНК-метилтрансферазы, некоторые шапероны гистонов и др.) на G4.

Представленные результаты исследования взаимодействий факторов репарации с G4-сайтом *N. gonorrhoeae* также отличаются новизной. Сайт интересен, прежде всего, как регулятор гомологичной рекомбинации *pilE/pilS* – основы антигенной вариации (в данном случае – изменчивости распознаваемых антителами хозяина участков пилина), которая позволяет патогену скрываться от иммунной системы. Ранее были установлены значимость G4 для антигенной

вариации и отрицательная корреляция между вариацией и активностью MMR. Однако, участвуют ли белки MMR (прежде всего, обладающий нуклеазной активностью MutL) в G4-зависимой инициации рекомбинации напрямую – открытый вопрос. Проверяемая в диссертации гипотеза об участии MutL сформулирована впервые. Результаты, хотя и не вносят окончательной ясности, дополняют представления о регуляции вирулентности и адаптации патогена.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ. Диссертационная работа построена традиционно. Первая глава является вводной; в ней сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы актуальность, новизна и значимость, раскрыта методология исследования. Вторая глава представляет собой обзор литературы и включает три раздела. В первом освещены ключевые механизмы репарации, во втором обобщена роль систем репарации в адаптации бактерий к внешним условиям, поддержании их изменчивости и вирулентности (на примере *N. gonorrhoeae*). Третий раздел раскрывает вклад системы эксцизионной репарации в поддержание стабильности генома человека и отчасти – его генетического разнообразия; представлено современное видение особенностей репарации G/C-богатых участков с указанием недостаточно изученных аспектов. В третьей главе собраны протоколы экспериментов, включая получение рекомбинантных белков, анализ их взаимодействий с потенциальными субстратами и оценку ферментативной активности; приведены последовательности олигонуклеотидов, использованных в качестве моделей фрагментов геномов.

В четвертой главе изложены результаты работы. Разделы этой главы согласуются с задачами. Первый касается одного из ключевых белков MMR – никирующей эндонуклеазы MutL. Уточняются условия гидролиза субстрата данным ферментом в рамках метил-независимой MMR. Выявлена необходимость присутствия субъединицы ДНК-полимеразы III – бета-зажима (по-видимому, этот белок позволяет дискриминировать корректную и поврежденную цепи). Выполнен сравнительный анализ нативного и мутантного вариантов MutL и сделаны выводы о значимости

высококонсервативных цистеиновых остатков для функционирования фермента. Во втором разделе с помощью анализа данных из открытых источников подтверждена ассоциация между дефицитом MutL/S и повышенной вариабельностью пилина в *N. gonorrhoeae*. В третьем охарактеризовано взаимодействие MutL (в присутствии бета-зажима) с G4 из регуляторной области *pilE* в оцДНК/дцДНК контексте: показано, что G4-содержащие ДНК эффективно связываются ферментом, но гидролиз (по крайней мере, в пределах G4) минимален. В завершение исследования влияния G/C на MMR в прокариотах (четвертый раздел) на гомологе MutS из *C. sphaeroides* показана частичная потеря специфичности к мисматчам в G/C-богатом дуплексе. Ключевой промежуточный вывод сформулирован как общее снижение эффективности MMR в G/C-богатых последовательностях.

Пятый и последний раздел целиком посвящен BER в G/C-богатых участках эукариот на примере регуляторного участка *hTERT* с тандемными G4. Установлено, что остатки дидезоксирибозы (F-сайты), имитирующие AP-сайты, оказывают дестабилизирующее действие на G4, часто некритичное. Фермент APE1 связывает F-сайты в составе G4, но эффективность гидролиза заметно снижена. Примечательно, что эффективность гидролиза также снижена (хоть и менее явно) при локализации F-сайта в противоположащей G4 C-богатой цепи. Диссертант объясняет это дестабилизацией дуплекса, смещением равновесия между дуплексом и G4 в сторону G4 и удержанием белка на G4. В совокупности эти данные объясняют дефицит репарации повреждений в G4-содержащем регуляторном участке *hTERT* и в итоге – закрепление мутаций – драйверов онкогенеза. Обзор наиболее вероятных путей закрепления мутаций и активации *hTERT* и повторный сокращенный обзор регуляции *pilE* приведены в заключительной (пятой) главе. В шестую главу вынесены выводы. Они логически вытекают из полученных результатов и соотносятся с задачами.

Работа выполнена с использованием современных методов, данные корректно интерпретированы, и результаты оформлены достаточно грамотно. Положения, выносимые на защиту, и основные выводы подкреплены

достаточным экспериментальным материалом, четко обоснованы, и их достоверность не вызывает сомнений. Работа является зрелым и глубоким исследованием, материал отлично структурирован. Незначительные замечания и спорные моменты приведены ниже.

ЗАМЕЧАНИЯ

1) В разделе 1.7 содержится следующий тезис: «Изменение эндонуклеазной активности MutL в G4 указывает на возможность белка принимать участие в регуляции процессов рекомбинации». Это анонс общего вывода по первой половине работы. Предпосылка к нему - повышение variability пилей (а значит и рекомбинации *pilE/pilS*) при дефиците MMR (недостатке активности MutL). Хотя на первый взгляд при дефиците репарации увеличение variability закономерно, в данном случае ожидалась другая закономерность: нуклеазная активность аффинной к G4 MutL могла бы способствовать рекомбинации по RecF-подобному пути (одноцепочечный разрыв требуется на первом этапе процесса). В диссертации данная гипотеза опровергнута: связывание MutL с G4 не сопровождается расщеплением G4, а расщепление фланков выражено умеренно. Это снижает кажущееся противоречие, но всё же не объясняет повышения частоты рекомбинации при дефиците MutL. Рискну предположить, что MutL в регуляторном участке *pilE* работает аналогично низкомолекулярному лиганду, специфичному к G4 – N-метилмезопорфируну, т.е. выступает конкурентным ингибитором оставшегося неизвестным фактора, который-таки вносит разрывы вблизи G4. Итого: тезис про “возможность белка принимать участие в регуляции процессов рекомбинации” был бы правомерен только в случае демонстрации конкуренции MutL с гидролизующим G4 белком-участником RecF-подобного пути. Увы, пока последний не идентифицирован, такие эксперименты невозможны.

2) Основной вопрос по второй части работы касается AP-сайтов. В обзоре литературы автор убедительно доказывает, что ожидаемая частота их возникновения в стабильных G4 мала, т.к. разрыв гликозидной связи требует

выворачивания основания, а G4-фолдинг этому препятствует, гликозилаза OGG1 не справляется. Если она не справляется, до APE1 дело просто не доходит.

3) В работе встречаются отдельные неудачные выражения (например, “спектры УФ-поглощения при 295 нм”), жаргонизмы (“связывание по Хиллу”), ошибки оформления (на стр. 101 обсуждение DMS-футпринтинга идет со ссылкой на Рис. 36А, а там футпринтинга нет) и не расшифрованные термины.. В качестве примера последнего приведу “количество взаимодействий” из обсуждения результатов моделирования (Рис. 23). Количество взаимодействий можно трактовать как число контактов/связей между белками или пар атомов, сближенных на расстояние не больше оговоренного критического. В целом подпись к Рис. 23 минималистична и не содержит всей необходимой информации. Также из мелких недостатков отмечу нехватку иллюстраций с экспериментальными данными: часто вместо исходных данных (например, электрофореграмм) или построенных по ним кривых связывания автор приводит только таблицы с параметрами (например, Таблицы 10 и 11). Это допустимо, но не позволяет зрительно оценить достоверность аппроксимации и т.д.

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
Заведующая лабораторией структуры и функций биополимеров
ФГБУН «Федеральный научно-клинический центр Физико-химической
медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-
биологического агентства»

Варижук Анна Михайловна

02.04.2026

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.01.03 – молекулярная биология
Адрес места работы:

119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

ФГБУН «Федеральный научно-клинический центр физико-химической
медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-
биологического агентства», лаборатория структуры и
функций биополимеров
+7 (499) 246-4409, info@rcrcm.org

Подпись сотрудника ФГБУН «Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства» А.М. Варижук удостоверяю:

Руководитель отдела кадров

Н.А. Васильева
02.04.2026