

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Алексеевой Ирины Владимировны
«Полиморфизмы белков-участников эксцизионной репарации оснований: влияние на
активность отдельных ферментов и их взаимную регуляцию»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 1.5.4 – биохимия**

Репарация повреждений в ДНК играет важную роль в защите генома человека от мутагенных повреждений. Дефекты и вариации в отдельных генах репарации ДНК у человека приводят к недостаточной работе систем репарации и развитию заболеваний. К наиболее частым генетическим вариациям относятся однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). По оценкам, до 30% SNP-замен в генах репарации могут влиять на активность белков [Köberle et al., 2016, Arch. Toxicol., doi: 10.1007/s00204-016-1771-2]. Множество SNP-замен, которые ассоциированы с различными видами рака и нейродегенеративными болезнями, найдено в генах, кодирующих ферменты и факторы эксцизионной репарации оснований (BER) [Kim et al., 2025, Mol. Cells, doi: org/10.1016/j.mocell.2025.100186]. Поиск возможных причин предрасположенности к заболеваниям является важной задачей, и исследования влияния SNP-мутаций белков и ферментов BER на их функциональные свойства, которые проводятся уже более 20 лет, до сих остаются актуальными. К этой области исследований относится диссертация Алексеевой И.В. Основными объектами исследования являются три фермента человека, участники BER: мультифункциональная AP-эндонуклеаза 1 (APE1) и два фермента семейства урацил-ДНК-гликозилаз (SMUG1 и MBD4).

Диссертация состоит из традиционных частей. В литературном обзоре описаны SNP-мутации всех ДНК-гликозилаз, APE1, ДНК-полимеразы β (Pol β), ДНК-лигазы III α (LigIII α), а также белка XRCC1, ответственного за координацию многостадийного процесса. Для каждого фермента приведены данные по специфичности и структурной организации. Многочисленные результаты исследований SNP-мутаций на функциональные свойства белков и их ассоциации с заболеваниями систематизированы в виде таблиц, что облегчает их анализ. Для APE1 подробно описаны предполагаемые альтернативные механизмы катализа. Обзор хорошо написан, с интересом читается и содержит достаточно информации о предметах исследования и проблеме в целом. Литературные данные по влиянию комплекса LigIII α -XRCC1 на активность Pol β при заполнении бреши в ДНК в составе нуклеосомы (ссылка [230]) описаны некорректно. К обзору литературы имеется заключение, в котором недостаточно обоснована необходимость исследований, выполненных в рамках диссертации. В частности, не сформулированы вопросы по механизму функционирования APE1.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные в работе материалы и экспериментальные методики, включая математическую обработку кинетических данных.

Несомненным достоинством работы является то, что большинство изучаемых в работе объектов получено самим соискателем, начиная с конструирования векторов и заканчивая очисткой рекомбинантных белков. К недостаткам этой части диссертации следует отнести неполные данные по анализу степени чистоты препаратов белков, которые не были индивидуальными.

В основной части диссертации представлены результаты исследований, сгруппированные в шесть подглав. В первых двух из них изучена функциональная роль семи остатков активного центра APE1: 1) для пяти остатков установлено влияние их замен на определенные стадии процесса путем регистрации конформационных изменений фермента и ДНК-субстратов в предстационарном режиме; 2) изучено влияние pH на связывание ДНК и катализ, что позволило уточнить каталитическую роль остатков His309 и Tyr171, неоднозначно интерпретируемую в других работах. Все мутанты изучались ранее, но для большинства из них впервые выполнен детальный кинетический анализ.

Следующие две подглавы посвящены детальному кинетическому исследованию ДНК-связывающих и каталитических свойств семи SNP-вариантов APE1, выбранных как потенциально значимые, а также влиянию этих мутаций на функциональные взаимодействия фермента с шестью другими участниками процесса BER. Для всех мутаций выявлено влияние на различные стадии функционирования фермента, а также на общую активность в отсутствие и в присутствии других белков. Из результатов исследований очевидно, что нарушения репарационной активности у носителей этих SNP-мутаций APE1 могут быть обусловлены изменением активности как самого фермента, так и репарационных комплексов. Вопрос о механизмах действия мутаций APE1 на координированную работу белков BER – сложная проблема, решение которой выходит за рамки данной диссертации. К недостаткам этой части работы следует отнести неполную статистическую обработку данных, представленных на Рис. 34. Непонятно, почему снижение активности в 2 раза и более статистически незначимо, в отличие от похожих по силе эффектов стимуляции. Более того, подавление активности некоторых мутантов APE в присутствии других белков, вообще не обсуждается. Влияние мутаций положительно заряженных остатков Arg, расположенных на поверхности белковой глобулы, рассматривается как потенциальное участие в белок-белковых контактах, а не в ДНК-опосредованных взаимодействиях между функционально-связанными белками.

Отдельная подглава посвящена изучению восьми SNP-вариантов двух ДНК-гликозилаз, SMUG1 и MBD4. Все выбранные мутации ассоциируют с различными видами рака. В данной работе показано, что все мутации MBD4 подавляют активность фермента, тогда как активность SMUG1 может подавляться либо усиливаться в зависимости от природы мутации. Большинство мутаций подавляют APE1-зависимую стимуляцию активности обеих гликозилаз. Из кинетических кривых на Рис. 36 видны сильные различия между мутантами и ферментом дикого типа в предельной степени расщепления субстрата, что может указывать

на разное сродство к ДНК. Поскольку регистрация собственной флуоресценции белков оказалась малочувствительной к взаимодействию с ДНК, было бы полезно оценить равновесные константы комплексообразования альтернативными методами. Выявленные эффекты SNP-мутаций ДНК-гликозилаз могут быть причиной снижения репарационной активности, ведущего к развитию рака, поэтому непонятно об отсутствии каких именно негативных последствий говорится в выводах (вывод 3).

В последней подглаве описан способ тестирования активности APE1 и ДНК-гликозилаз различной специфичности в экстрактах клеток различных опухолевых линий человека с использованием предложенных флуоресцентно-меченных ДНК-зондов. Метод запатентован и имеет практическое значение для разработки методов анализа репарационного статуса организма у онкопациентов. Однако не стоит оценивать концентрацию белков в экстрактах из сравнения их активности с активностью индивидуальных рекомбинантных ферментов.

Все полученные в работе данные в основном хорошо описаны и полностью представлены в виде графиков, таблиц и гистограмм. Текст содержит ограниченное число опечаток, но встречаются некорректные фразы и целые предложения: «путей репарации ДНК, вызванных повреждающими агентами» (с. 5), «пары аденина с 8-охоG в процессе транскрипции» (с. 13), «гидролизуемой/расщепляемой фосфатной группой» (с. 35, 36 и 67), «блокируя их флуоресценцию» (с. 70), «взаимодействию фермента с расщепляемой фосфодиэфирной связью» (с. 73), «статистические отличия эффектов», «поскольку АП-эндонуклеаза является многофункциональным ферментом, аминокислотные замены, ассоциированные с SNP, могут оказывать большое влияние как на различные каталитические функции APE1, так и на взаимодействия с другими ферментами BER или нуклеосомой» (с. 41).

В диссертации имеется заключение, в котором описаны основные полученные результаты и использованные для этого подходы. Содержание текста полностью отражает актуальность и новизну выполненных исследований.

Диссертационная работа представляет завершённое исследование, в котором впервые:

- 1) выполнен детальный кинетический анализ функциональной роли пяти аминокислотных остатков активного центра APE1 человека в многостадийном процессе связывания и каталитического превращения AP-сайт-содержащих ДНК; 2) выявлено влияние pH среды на скорость ферментативной реакции на стадии формирования фермент-субстратного комплекса и катализа; 3) выявлено влияние ряда полиморфных мутаций APE1 на активность самого фермента и ее регуляцию другими участниками процесса BER; 4) для большинства исследованных SNP-вариантов ДНК-гликозилаз, ассоциированных с разными видами рака, показана низкая ферментативная активность и отсутствие APE1-зависимой стимуляции. Полученные результаты детализируют и уточняют роль отдельных остатков активного центра APE1 в механизме гидролиза AP-сайтов, которая до сих пор дискутируется в литературе. Результаты исследований SNP-вариантов разных ферментов эксцизионной репарации

оснований указывают на то, что недостаточная активность систем репарации как причина развития рака может быть обусловлена как изменением активности отдельных ферментов, так и нарушениями в механизмах координации и регуляции процессов репарации в целом.

Полученные соискателем результаты, достоверность которых не вызывает сомнений, имеют безусловную научную ценность для понимания молекулярных основ клеточных механизмов, обеспечивающих сохранение генома и жизнеспособность организмов. Замечания к работе носят в основном дискуссионный характер.

Основные результаты диссертации опубликованы в шести статьях в рецензируемых научных журналах.

Представленные выводы соответствуют поставленным в диссертационной работе целям и полностью отражают объём полученного экспериментального материала.

Автореферат диссертации в достаточной мере отражает основное содержание и объём исследований, выполненных в соответствии с поставленной целью.

Диссертация Алексеевой И.В. полностью соответствует требованиям п.п. 2.1-2.5 «Положения о присуждении учёных степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», предъявляемых к кандидатским диссертациям, и соискатель заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Д.х.н., доцент, в.н.с. ИХБФМ СО РАН



Моор Н.А.

Подпись Моор Н.А. заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.б.н.



Логашенко Е.Б.
03.02.2025

Моор Нина Александровна, д.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоорганической химии ферментов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8; тел.: +7 383 363 51 96, E-mail: moor@niboch.nsc.ru