

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **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»

Представленная к защите работа Алексеевой И.В. посвящена исследованию влияния природных полиморфизмов (SNPs) в генах ферментов репарации на функциональную активность конкретного фермента и нарушение белок-белковых взаимодействий с другими участниками BER. На эффективность системы BER могут влиять природные полиморфизмы (SNPs) в генах ферментов репарации, что потенциально увеличивает риск различных заболеваний, включая онкологические. Однако взаимосвязь между SNPs и их влиянием на функциональность ферментов или нарушение белок-белковых взаимодействий в рамках BER до сих пор активно исследуется. В данной работе автор на примере человеческой АП-эндонуклеазы APE1 провел анализ ферментативных свойств мутантных форм с заменами ключевых аминокислот активного центра и изучил роль ионогенных остатков фермента. Уточнены функции отдельных аминокислот, выявлено влияние pH на этапы ферментативного процесса: распознавание повреждений, формирование фермент-субстратного комплекса и каталитическую стадию. Проведен анализ SNP-ассоциированных вариантов ферментов SMUG1, MBD4 и APE1, получены рекомбинантные формы 15 новых SNP-вариантов, изучены их взаимодействия с поврежденными ДНК и влияние других компонентов BER на их активность. Разработан и апробирован метод оценки активности ключевых ферментов BER на клеточных линиях человека.

Актуальность работы не вызывает сомнений, представленные исследования решают фундаментальную проблему влияния SNPs в генах ферментов репарации на функциональную активность конкретного фермента и координированное взаимодействие с другими участниками BER.

Общая характеристика

Работа изложена на 150 страницах, включая страницы со списком используемой литературы, содержит 45 рисунков, 5 схем и 23 таблицы. Работа содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и Методы», «Результаты и их

Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список используемых сокращений» и «Список литературы».

Обзор литературы посвящен рассмотрению влияния природных полиморфизмов ферментов эксцизионной репарации оснований на их каталитическую эффективность и процессы белок-белкового взаимодействия. В нем подробно рассмотрены имеющиеся в этой области на сегодняшний день данные об основных участниках BER: ДНК-гликозилазах, АП-эндонуклеазе 1, ДНК-полимеразе β и комплексе ДНК-лигазы III α с XRCC1. Обзор включает в себя информацию из 233 источников, дает подробное представление о вопросе исследования на текущий момент и позволяет сделать вывод об актуальности и практической ценности рецензируемой диссертационной работы. Раздел «Материалы и методы» подробно описывает процедуры, использованные при проведении исследований. Раздел «Результаты и их обсуждение» занимает большую долю в общем объеме диссертации и разделен на шесть частей: «Анализ влияния замен аминокислотных остатков активного центра APE1 в составе мутантных форм D210N, N212A, T268D, M270A и D308A на скорость и эффективность узнавания, связывания и превращения специфических субстратов», «Анализ роли заряженных аминокислотных остатков в функционировании APE1», «Анализ влияния полиморфизмов APE1 на процессы связывания, узнавания и катализа», «Анализ влияния SNP-ассоциированных замен APE1 на регуляцию активности фермента другими участниками BER», «Анализ влияния полиморфизмов ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4^{cat} на процессы взаимодействия с ДНК-субстратом» и «Апробация тест-системы определения активности ключевых ферментов-участников пути BER в клеточных экстрактах».

Основные результаты и их достоверность

В ходе исследований автором был проведен детальный анализ ферментативных свойств человеческой АП-эндонуклеазы APE1 на примере ряда искусственно созданных мутантных форм, содержащих замены аминокислотных остатков, которые предположительно играют ключевую роль в функционировании активного центра фермента. Особое внимание уделялось исследованию роли заряженных аминокислотных остатков, участвующих в катализе. Полученные данные позволили уточнить функции отдельных аминокислотных остатков активного центра APE1 и выявить влияние изменений pH среды на такие важные стадии ферментативного процесса, как распознавание повреждений ДНК, формирование фермент-субстратного комплекса и проведение каталитической реакции.

Кроме того, в рамках работы был выполнен анализ известных SNP-ассоциированных вариантов ферментов SMUG1, MBD4 и APE1, включая их структурные и функциональные особенности. Были получены рекомбинантные препараты 15 SNP-вариантов этих ферментов, что позволило изучить их взаимодействие с поврежденными ДНК-субстратами в изолированных условиях. Также была проведена оценка влияния дополнительных компонентов системы эксцизионной репарации оснований (BER) на ферментативную активность этих вариантов. На основании полученных результатов выдвинуты гипотезы о влиянии SNP-ассоциированных замен на координацию взаимодействий ферментов внутри системы BER.

Практическая значимость исследования заключается в разработке нового метода оценки активности ключевых ферментов BER. Этот метод был апробирован на ряде человеческих клеточных линий, что подтверждает его применимость для анализа функционального состояния системы репарации в различных биологических системах. Результаты работы представляют собой значительный вклад в понимание молекулярных механизмов репарации ДНК и их регуляции, а также открывают перспективы для дальнейшего изучения взаимосвязи генетических полиморфизмов с рисками развития заболеваний, связанных с нестабильностью генома.

По результатам проведенных исследований были сформулированы 5 выводов, которые полностью обоснованы и доказаны. Работа Алексеевой И.В. выполнена на высоком экспериментальном и научном уровнях и является завершенным научным исследованием. Тем не менее, к работе имеется ряд замечаний:

1. Первый раздел результатов посвящен определению влияния замен аминокислотных остатков активного центра APE1 в составе мутантных форм D210N, N212A, T268D, M270A и D308A, однако в тексте диссертации соискатель не описывает критерии выбора данных аминокислотных остатков фермента и критерии их замены на аланин, аспарагиновая кислота или аспарагин. На основании чего замены именно этих остатков активного центра были включены в работу, а не ряд других, описанных в обзоре литературы на стр. 32-38?
2. В ходе выяснения роли ионизованных аминокислотных остатков активного центра APE1 в процессах образования каталитического комплекса и протекания реакции гидролиза фосфодиэфирной связи сделан заключение о том, что

функциональные роли His309 и Tyr171 на протяжении всей реакции находятся под контролем ионизированного состояния этих остатков. Для подтверждения данного предположения было бы целесообразно получить мутантные формы АП-эндонуклеазы, содержащие замены того или иного остатка, а также получить двойную мутантную форму. Анализ каталитической активности таких мутантных форм в разных рН позволил бы верифицировать роль этих остатков в каталитическом процессе.

3. В разделе обсуждения результатов, касающихся активности природных полиморфных вариантов фермента, следовало указать данные о встречаемости таких вариантов в популяции людей.
4. Соискателем предложена и апробирована методика определения активности ключевых ДНК-гликозилаз и АП-эндонуклеазы 1 человека в клеточных экстрактах с использованием коротких шпилечных ДНК-зондов. Небольшой размер дуплексной части (17 нуклеотидов, включая поврежденный нуклеотид), в этих структурах должен позволять связаться с этим участком только одному ферменту. При этом, клеточные экстракты, использованные для определения активности, содержат большое количество разнообразных белков, в том числе белков, взаимодействующих с ДНК. Можно ли предполагать, что данные неспецифические белки будут связывать ДНК-зонд, блокируя связывание с зондом целевых ДНК-гликозилаз или АП-эндонуклеазы 1? Более того, может ли связывание одних ДНК-гликозилаз приводить к неспецифическому блокированию связывания целевых ферментов? Зависит ли конкуренция белков за связывание с ДНК-зондом от размера дуплексной части и может ли изменение этого размера привести к изменению регистрируемой активности целевых ферментов? Ответы на данные вопросы в тексте диссертации отсутствуют.
5. Кроме того, следует отметить, что в тексте диссертации содержатся незначительные опечатки и неудачные выражения.

Перечисленные недочеты и замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической значимости работы. Достоверность результатов исследования не вызывает сомнений. Работа выполнена на достаточном материале, выводы хорошо аргументированы и подтверждены экспериментальными данными. Материалы диссертации легли в основу 5 научных статей в рецензируемых журналах и

одного патента. Все журналы индексируются в международных базах Web of Science и/или Scopus. Результаты работы были представлены на международных и российских конференциях. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Диссертационная работа 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», предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – «биохимия».

Заместитель директора по науке,
главный научный сотрудник
Заведующий лабораторией
химии протеолитических ферментов
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

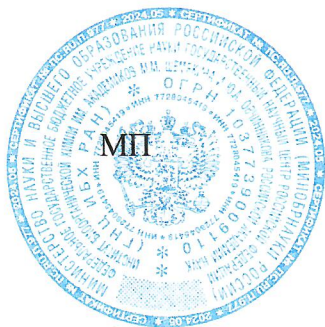
чл.-корр. РАН, доктор химических наук

Смирнов Иван Витальевич

Почтовый адрес: 119997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

E-mail: ivansmr@inbox.ru, office@ibch.ru

+7(495) 335-01-00



28 января 2025г.