

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Давлетгильдеевой Анастасии Тимуровны
«Кинетические механизмы действия AP-эндонуклеаз из разных структурных
семейств», представленную на соискание ученой степени кандидата химических
наук по специальности 1.5.4 – биохимия**

Исследование механизмов репарации ДНК представляет актуальную проблему, поскольку эта область напрямую связана как с пониманием фундаментальных механизмов сохранения генома, так и с поиском оптимальных способов лечения тяжелых наследственных и онкологических заболеваний человека. Одной из важнейших систем репарации ДНК является эксцизионная репарация оснований, которая обеспечивает коррекцию самых многочисленных повреждений – модифицированных азотистых оснований и апуриновых/апириимидиновых (AP) сайтов. Диссертационная работа посвящена изучению механизмов функционирования эукариотических AP-эндонуклеаз из эволюционно различных организмов, принадлежащих тому же структурному семейству, что и хорошо изученная APE1 человека, а также одного фермента из другого структурного семейства. Эти ферменты мультифункциональные. Известно, что APE1 человека помимо различных ферментативных функций в репарации ДНК и РНК участвует в регуляции транскрипции как окислительно-восстановительный фактор. В диссертационной работе выполнено сравнение не только основной активности этих ферментов в расщеплении AP-сайтов, но и двух дополнительных: 3',5'-экзонуклеазной активности и так называемой NIR-активности. Такое сравнительное исследование безусловно является актуальным, поскольку вопрос каким образом обеспечиваются разные активности одним активным центром остается пока нерешенным.

Диссертация состоит из традиционных частей. В литературном обзоре описаны все повреждения ДНК, в репарации которых участвуют AP-эндонуклеазы; охарактеризованы все известные функции APE1 человека и представлены известные данные об активности AP-эндонуклеаз, гомологичных ферменту человека и принадлежащих двум другим структурным семействам. Описаны структурные данные о взаимодействии разных AP-эндонуклеаз с ДНК-субстратами и различия между ними. В заключении к обзору сформулированы вопросы, требующие дополнительных исследований, и обоснована необходимость изучения динамики взаимодействия разных AP-эндонуклеаз с разнотипными субстратами для выявления общих закономерностей и отличий в многостадийных процессах связывания и каталитического превращения субстратов. Обзор хорошо написан, с интересом читается и содержит достаточно информации об исследуемых объектах и их биологической значимости. Однако для полного представления о механизмах действия мультифункционального фермента APE1 следовало бы

представить данные о регуляции его активностей посттрансляционными модификациями, которые особенно разнообразны и многочисленны у этого фермента.

В разделе «Материалы и методы» достаточно подробно описаны использованные в работе материалы и методы, и математическая обработка экспериментальных данных. Несомненным достоинством работы является то, что все исследуемые ферменты, кроме фермента человека, получены самим соискателем, начиная с конструирования векторов и заканчивая очисткой рекомбинантных белков.

В основной части диссертации представлены результаты исследований, сгруппированные в три блока. В первом блоке изучены субстратные свойства неканонических AP-сайт-содержащих ДНК-структур в реакции, катализируемой ферментом APE1 человека. Структурная топология AP-сайт-содержащих квадруплексов надежно охарактеризована. Взаимодействие этих ДНК с ферментом человека в процессе формирования комплексов и каталитического превращения впервые исследовано независимыми методами, что позволило описать детальный кинетический механизм. Активность APE1 человека в расщеплении AP-сайта в неканонических ДНК-дуплексах с выпетливанием поврежденной или неповрежденной цепи изучена впервые. Подобные ДНК могут возникать при нарушении процесса репарации, и вопрос о возможности их повторной репарации чрезвычайно важен для понимания эффективности процесса. К недостаткам этой части работы следует отнести: 1) отсутствие в подписи к рис. 23 пояснения к тому, учитывался ли при оценке степени превращения AP-сайт-содержащих ДНК продукт экзонуклеазной реакции; 2) отсутствие обоснования применения метода микроскопического термофореза для определения равновесных констант связывания ДНК-субстратов, дающего большую ошибку из-за низкой амплитуды изменения флуоресценции.

Во втором блоке, посвященном сравнению трех структурно гомологичных APE1 человека ферментов разного эволюционного происхождения, исследованы их AP-эндонуклеазная и 3',5'-экзонуклеазная активности, а также активность в расщеплении четырех субстратов с разными модифицированными основаниями. Для этих ферментов исследованы зависимости основной AP-эндонуклеазной активности от концентрации одно- и двухзарядных катионов и найдено сходство оптимальных условий. Изучена конформационная динамика комплексов с AP-сайт-содержащим субстратом и каноническим ДНК-дуплексом (имитирующим неповрежденную ДНК), что позволило выявить сходство всех ферментов в стабильности каталитически компетентного комплекса с основным субстратом и значительное отличие фермента дрозофилы от остальных в скорости последней регистрируемой стадии. В тоже время, для каждого из четырех гомологичных ферментов найдены отличия в их взаимодействии с неповрежденной ДНК. Впервые показано, что NIR-активность присуща

всем ферментам разного происхождения: они сравнимы в эффективности расщепления трех из 4-х разных субстратов, хотя существенно различаются между собой в кинетических параметрах связывания каждого из субстратов. В целом, полученные результаты по распознаванию различных повреждений ферментами структурного семейства Xth позволили предположить, что эффективность расщепления поврежденной ДНК связана с тонкой конформационной подстройкой фермента и субстрата, необходимой для формирования каталитически компетентного состояния. 3',5'-Экзонуклеазная активность в расщеплении выбранного субстрата оказалась очень низкой для всех ферментов, кроме APE1 человека. Однако эти данные следует интерпретировать с осторожностью, поскольку они получены в условиях, оптимальных для AP-эндонуклеазной активности. Из других же исследований известно, что оптимальные условия для тестирования разных активностей AP-эндонуклеаз сильно различаются и могут быть неодинаковыми даже для разных субстратов. Выявленные различия между гомологичными ферментами соискатель обсуждает в основном, анализируя замены функциональных остатков С-концевого каталитического домена, хотя не исключает влияния на процессы связывания ДНК N-концевых фрагментов, которые сильно различаются у данных белков по размерам и значениям pI. Интересно отметить, что ряд уменьшения стабильности первичного комплекса ферментов с неповрежденной ДНК (Таблица 5) строго коррелирует с рядом увеличения суммарного заряда N-концевых фрагментов, что указывает на участие последних в формировании этого комплекса. Более того, для фермента дрозофилы, у которого этот фрагмент несет самый высокий электроположительный заряд, значительное отличие в скорости последней стадии взаимодействия с AP-сайт-содержащим субстратом, зарегистрированной методом предстационарной кинетики, не согласуется с данными стационарной кинетики, что может быть обусловлено низкой скоростью диссоциации продукта, удерживаемого неспецифическими взаимодействиями с N-концевым фрагментом. Полученные результаты позволяют рассматривать фермент дрозофилы как перспективный объект для исследования функциональной роли N-концевого фрагмента, специфичного для эукариотических ферментов.

Третий блок исследований посвящен детальному изучению активностей ДНК-эндонуклеазы EndoQ, обнаруженной недавно у архей и обладающей активностями AP-эндонуклеазы и урацил-ДНК-гликозилазы. В данной работе выполнено впервые детальное кинетическое исследование AP-эндонуклеазной и NIR-активностей этого фермента с использованием большого набора двухцепочечных ДНК-субстратов, различающихся природой основания напротив повреждения, и одноцепочечных ДНК. Эти исследования позволили установить общий кинетический механизм взаимодействия с разными субстратами, и выявить характерные лишь для определенных субстратов стадии, наглядно

продемонстрированные на предложенной схеме (рисунок 48). Выявлена более строгая специфичность фермента EndoQ по сравнению с ферментами семейства Xth, которая может обеспечиваться формированием специфических контактов с поврежденным азотистым основанием. Эта часть работы хорошо написана и обсуждена с учетом известных структурных данных. Полученные результаты показывают биологическую роль процесса NIR как альтернативного механизма удаления поврежденных оснований ДНК.

В диссертации имеется заключение, в котором суммированы основные полученные результаты в сравнении с известными в литературе данными. Текст заключения хорошо написан и дает полное представление об актуальности, новизне и оригинальности выполненных исследований.

Диссертационная работа Давлетгильдеевой А.Т. представляет завершенное исследование, в котором впервые: 1) изучено влияние неканонической структуры ДНК на активность APE1 человека в расщеплении AP-сайтов; 2) выявлены общие закономерности и отличительные особенности структурно гомологичных AP-эндонуклеаз различного эволюционного происхождения и принадлежащих двум разным структурным семействам в механизмах их действия по отношению к ДНК-субстратам с разнотипными повреждениями (AP-сайтами и модифицированными основаниями). Полученные результаты позволили в совокупности с литературными данными описать общий механизм узнавания различных повреждений ферментами семейства Xth, в котором дискриминация и эффективность превращения поврежденной ДНК определяются в первую очередь конформационной подстройкой субстрата в активном центре. Для фермента EndoQ предложен постадийный механизм функционирования, включающий формирование специфических контактов фермента с поврежденным азотистым основанием. Полученные соискателем результаты, достоверность которых не вызывает сомнений, имеют безусловную научную ценность для понимания молекулярных основ клеточных механизмов, обеспечивающих сохранение генома и жизнеспособность организмов. Рукопись диссертации хорошо оформлена и содержит немногочисленные опечатки и неудачные фразы. Замечания к работе носят в основном дискуссионный характер.

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

Представленные выводы обоснованы, соответствуют поставленным в диссертационной работе целям и полностью отражают объем полученного экспериментального материала.

Аннотация диссертации в достаточной мере отражает основное содержание и объем выполненных исследований, соответствующие идеям и выводам.

Диссертация Давлетгильдеевой А.Т. 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.х.н.



Новопашина. Д.С.



12.09.2022

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