

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Давлетгильдеевой Анастасии Тимуровны «*Кинетические механизмы действия AP-эндонуклеаз из разных структурных семейств*», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – “*биохимия*”

Апуриновые/апириимидиновые эндонуклеазы являются одними из ключевых участников системы эксцизионной репарации оснований ДНК. Считается, что основной биологической функцией этих ферментов является их AP-эндонуклеазная активность. Однако, известно, что эти ферменты способны узнавать в качестве субстратов не только AP-сайты, но широкий спектр других поврежденных оснований. Несмотря на большой интерес к выяснению механизмов распознавания нуклеотидов-мишеней AP-эндонуклеазами и природы контактов, которые определяют специфичность этих ферментов к широкому спектру различных поврежденных и неповрежденных нуклеотидов, вопрос о том, как конкретный нуклеотид распознается активным центром фермента, до сих пор остается неясным. В связи с этим **актуальность** работы по исследованию механизмов взаимодействия пяти AP-эндонуклеаз, принадлежащих к структурным семействам Xth и EndoQ, с модельными ДНК-субстратами, содержащими различные типы поврежденных нуклеотидов и обладающими неканонической структурой, не вызывает сомнений.

Научная новизна работы определяется тем, что в результате исследования было решено несколько важных фундаментальных задач. В представленной работе впервые было проведено детальное кинетическое исследование взаимодействия AP-эндонуклеазы человека hAPE1 с ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой; AP-эндонуклеаз zAPE1 из *Danio rerio*, xAPE1 из *Xenopus laevis* и Rrp1 из *Drosophila melanogaster*, принадлежащих к семейству Xth, и ДНК-эндонуклеазы EndoQ из *Pyrococcus furiosus*, с ДНК-субстратами, содержащими различные типы повреждений, а также с неповрежденной ДНК. Было показано, что ферменты структурного класса Xth схожим образом связывают ДНК-субстрат, содержащий аналог AP-сайта, в то время как связывание более объемных повреждений, требующее тонкой конформационной подстройки фермента и субстрата внутри активного центра, происходит с заметными отличиями в эффективности. В то же время характер взаимодействия фермента EndoQ с различными поврежденными ДНК-субстратами значительно отличается от ферментов семейства Xth, несмотря на перекрывающуюся субстратную специфичность. Сопоставление полученных в работе результатов с имеющимися литературными

данными позволило автору установить механизм взаимодействия hAPE1 с поврежденными ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой, установить общие закономерности и отличительные особенности механизмов узнавания поврежденных нуклеотидов в ДНК ферментами, принадлежащими к структурным семействам Xth и EndoQ, и предложить модель кинетического механизма взаимодействия всех изученных ферментов с поврежденной ДНК.

Общая характеристика

Диссертационная работа изложена на 183 страницах, содержит 48 рисунков, 9 схем и 9 таблиц. Работа имеет общепринятую структуру и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и Методов, Результатов и их Обсуждения, Заключение, Выводов, Списка сокращений и Списка цитируемой литературы.

В первой главе диссертации представлен обзор литературы, в котором автор приводит сведения об основных типах необъемных повреждений оснований ДНК и о структурно функциональных особенностях AP-эндонуклеаз, принадлежащих различным семействам. Основное внимание автор уделил современным данным и представлениям о структурной организации и субстратной специфичности AP-эндонуклеазы 1 человека hAPE1 и ДНК-эндонуклеазы EndoQ из *Pyrococcus furiosus*.

В целом, обзор литературы включает в себя информацию из 347 источников, значительная часть которых относится к работам последних лет, и позволяет сделать вывод об актуальности, новизне и практической ценности рецензируемой диссертационной работы. Также обзор литературы содержит раздел **Заключение**, который существенно помогает читателю обобщить информацию из литературных источников по теме настоящего исследования.

Во второй главе приведена информация об использовавшихся материалах и методах исследования. Методы описаны достаточно подробно и не вызывают сомнений.

Основные результаты и их достоверность

В третьей главе изложены результаты работы и их обсуждение. Раздел включает в себя три логически разделенных части: «Активность апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека hAPE1 по отношению к поврежденной ДНК с неканонической структурой», «Сравнительный анализ субстратной специфичности AP-эндонуклеаз из семейства Xth» и «Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза EndoQ из *Pyrococcus furiosus*». В первой части автор проводит исследование активности фермента hAPE1 по отношению к ДНК-субстратам, обладающим неканонической структурой. Полученные

данные в совокупности с анализом имеющейся литературы позволили автору предложить общий механизм распознавания нуклеотидов-мишеней ферментом hAPE1. В данной модели узнавания специфического сайта формирование первичного фермент-субстратного комплекса является ключевым фактором, обеспечивающим специфичность фермента к определенным поврежденным или неповрежденным нуклеотидам. Во втором разделе автор проводит сравнительный анализ активности ферментов Rgp1, xAPE1 и zAPE1, принадлежащих к структурному семейству Xth. Полученные данные по конформационной динамике меченых FRET-парой ДНК-субстратов, содержащих различные повреждения, а также неповрежденного ДНК-дуплекса, в процессе взаимодействия с исследуемыми ферментами, позволили детализировать модель распознавания субстратов ферментами типа APE1, предложенную для hAPE1. Третий раздел работы посвящен исследованию механизма взаимодействия фермента EndoQ с модельными поврежденными и неповрежденными ДНК-субстратами и проведению сравнения с данными о механизме действия представителей структурного семейства Xth. Третья глава диссертации также содержит раздел **Заключение**, что позволяет обобщить результаты работы и существенно облегчает ее восприятие.

По диссертационному исследованию имеются некоторые вопросы и замечания:

1. В работе присутствует некоторое количество опечаток.
2. Сложность восприятия некоторых рисунков. Например, на рисунке 1 отсутствуют полные названия азотистых оснований. Рисунок 4- отсутствует полное название фермента, что также несколько усложняет его восприятие читателем.
3. На рисунке 6 в описании перепутаны цвета, обозначающие элементы вторичной структуры.
4. На стр. 89 указаны номера остатков триптофана в ферменте hAPE1 (структура PDB 1DE8), за счет которых может происходить тушение флуоресценции. Также на рисунке 30 диссертации даны положения этих остатков в первичной структуре фермента. При этом, не указано, где именно в пространственной структуре фермента локализованы эти остатки. Эта информация была бы полезна читателю для пояснения потенциальной возможности тушения флуоресценции при образовании комплекса с этим ферментом.

5. На некоторых рисунках, содержащих результаты электрофореза, нет дорожек с соответствующими маркерами молекулярных масс. Это несколько усложняет восприятие полученных результатов.

Перечисленные недочеты и замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической значимости работы. Не вызывает сомнений, что результаты исследования достоверны, выполнены на достаточном материале, хорошо аргументированы и подтверждены экспериментальными данными, полученными с использованием современных методов проведения научных исследований. Выводы диссертационной работы корректны и полностью обоснованы полученными экспериментальными данными. По материалам диссертации опубликовано 3 научных статьи в рецензируемых журналах. 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.

Заключение

Диссертация **Давлетгильдеевой Анастасии Тимуровны** является завершенным научным исследованием, выполненным автором самостоятельно на высоком научном уровне и посвященным исследованию механизмов взаимодействия пяти AP-эндонуклеаз, принадлежащих к структурным семействам Xth и EndoQ, с модельными ДНК-субстратами, содержащими различные типы поврежденных нуклеотидов и обладающими неканонической структурой, методами предстационарной кинетики. Выводы к диссертационной работе соответствуют поставленным цели и задачам. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание кинетических механизмов взаимодействия AP-эндонуклеаз из структурных семейств Xth и EndoQ с поврежденной ДНК.

Рассматриваемая диссертационная работа по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне полученных результатов 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, так как в работе содержатся новые данные о кинетических механизмах взаимодействия AP-эндонуклеазы человека hAPE1 с ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой; AP-эндонуклеаз zAPE1

из *Danio rerio*, хАРЕ1 из *Xenopus laevis* и Rrp1 из *Drosophila melanogaster*, принадлежащих к семейству Xth, а также ДНК-эндонуклеазы EndoQ из *Pyrococcus furiosus*, с ДНК-субстратами, содержащими различные типы повреждений, а также с неповрежденной ДНК. Автор работы, **Давлетгильдеева Анастасия Тимуровна**, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности **1.5.4 – «биохимия»**.

Старший научный сотрудник лаборатории Молекулярной инженерии

Института биохимии им. А.Н. Баха

ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

д.х.н.



/ Пометун А.А./

12.09.2022

Почтовый адрес: Ленинский пр-т., 33 стр.2, Москва, 119071

E-mail: aapometun@gmail.com

Подпись Пометун А.А. заверяю

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН

к.б.н., Орловский А.Ф.

