

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **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»

Представленная к защите работа Давлетгильдеевой А.Т. посвящена исследованию механизмов взаимодействия AP-эндонуклеаз, принадлежащих к структурным семействам Xth и EndoQ, с модельными ДНК-субстратами, содержащими различные типы поврежденных нуклеотидов и обладающими неканонической структурой. Несмотря на большой интерес исследователей к выявлению факторов, обуславливающих субстратную специфичность AP-эндонуклеаз к широкому спектру повреждений, обладающих различной структурой, вопрос о том, как именно происходит дискриминация конкретного поврежденного или неповрежденного нуклеотида в единственном активном центре фермента, остается неясным. В данной работе автором проведено кинетическое исследование пяти AP-эндонуклеаз из разных структурных семейств и организмов с привлечением методов предстационарной кинетики.

Актуальность работы не вызывает сомнений, представленные исследования решают фундаментальную проблему особенностей репарации ДНК AP-эндонуклеазами. Различные типы повреждений ДНК играют ключевую роль в развитии мутагенеза, раковых заболеваний и старении. Большое количество исследований посвящено системам репарации, отвечающим за исправление этих повреждений, и AP-эндонуклеазы играют одну из ключевых ролей в этих процессах. Подробное изучение факторов, определяющих уникальную способность этих ферментов распознавать и удалять из ДНК различные по своей природе повреждения, позволит усовершенствовать методы контроля их репарационной активности.

### **Общая характеристика**

Работа изложена на 183 страницах, включая страницы со списком используемой литературы, содержит 48 рисунков, 9 схем и 9 таблиц. Работа содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и Методы», «Результаты и их Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список цитируемой литературы».

Обзор литературы включает в себя описание имеющихся на данный момент сведений о различных типах необъемных повреждений оснований ДНК и способах их репарации в живых организмах. Вторая часть обзора посвящена структурным и функциональным особенностям AP-эндонуклеаз, принадлежащих к структурным семействам Xth, Nfo и EndoQ. Обзор включает в себя информацию из 347 источников, дает подробное представление о состоянии области 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 основную долю в общем объеме диссертации и разделен на три 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/апириμιдиновая эндонуклеаза EndoQ из *Pyrococcus furiosus*».

### **Основные результаты и их достоверность**

В ходе исследований автором были изучены конформационные изменения ДНК-субстратов, содержащих в качестве повреждения аналог AP-сайта (F-сайт) и обладающих неканонической структурой, в процессе взаимодействия с AP-эндонуклеазой человека hAPE1. На основании данных, полученных в стационарных условиях и методом «остановленного потока», в сочетании с данными, имеющимися в литературе, автором был предложен общий механизм распознавания нуклеотидов-мишеней ферментом hAPE1. В данной модели узнавания специфического сайта в нуклеиновой кислоте ключевым фактором, обеспечивающим специфичность фермента к определенным поврежденным или неповрежденным нуклеотидам, является формирование первичного фермент-субстратного комплекса. Также автором были проведены кинетические исследования трех AP-эндонуклеаз, принадлежащих к семейству Xth, из различных организмов: zAPE1 из *Danio rerio*, xAPE1 из *Xenopus laevis* и Rrp1 из *Drosophila melanogaster*. Сравнительный анализ активности исследуемых ферментов по отношению к ДНК-субстратам, содержащим различные повреждения, позволил детализировать модель распознавания субстратов ферментами типа APE1, предложенную для hAPE1. Кроме того, аналогичные исследования были проведены с ДНК-эндонуклеазой EndoQ из *Pyrococcus furiosus*. Автором было проведено подробное исследование механизма взаимодействия фермента EndoQ с модельными поврежденными и неповрежденными ДНК-субстратами. Полученные данные позволили сравнить данные о кинетических особенностях нового фермента из *Pyrococcus furiosus* с данными о механизме действия представителей структурного семейства Xth и предложить модель кинетического механизма взаимодействия EndoQ с ДНК, содержащей различные повреждения.

По результатам проведенных исследований были сформулированы 4 вывода, которые полностью обоснованы и доказаны. Работа Давлетгильдеевой А.Т. выполнена на высоком экспериментальном и научном уровнях и является завершенным научным исследованием. Тем не менее, к работе имеется ряд замечаний:

При обсуждении влияния размера и положения выпетливания поврежденной цепи на активность расщепления ДНК-субстрата ферментом hAPE1 автор утверждает, что позиция выпетливания в субстрате F/ $\Delta 2(3')$  блокирует формирование каталитически активного комплекса, в то время как остаточная активность на этом субстрате сохраняется. Данную формулировку следовало бы заменить на «значительно снижает эффективность».

В работе получен интересный результат при анализе влияния двухвалентных катионов на AP-эндонуклеазную и 3'-5'-экзонуклеазную активность. Было обнаружено, что только hAPE1 проявляет 3'-5'-экзонуклеазную активность по отношению к модельной неповрежденной ДНК. Чем можно объяснить такое наблюдение при том, что каталитические домены изучаемых ферментов имеют очень высокую схожесть?

Кроме того, в тексте диссертации содержатся незначительные опечатки.

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 3 научных статей 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.

Диссертационная работа 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», 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».

Заведующий лабораторией  
химии протеолитических ферментов  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

чл.-корр. РАН, д.х.н.

Смирнов Иван Витальевич

Почтовый адрес: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10к1.  
E-mail: smirnov@ibch.ru

Подпись *Смирнова И.В.* удостоверяю

Ученый секретарь

/ *Олейников Владимир Александрович*

ФГБУН Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

доктор физ.-мат.наук

12 сентября 2022

