



МИНОБНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
123182 Москва, пл. Акад. Курчатова, д. 2
Тел. (499)196-0000, Факс (499)196-0221, www.img.ras.ru
E-mail: img@img.ras.ru
ИНН/КПП 7734021670/773401001, ОКПО 04683332, ОГРН 1027739480955

19.11.18. № 1231/457 []

На № _____

[]

О Т З Ы В

ведущей организации на диссертационную работу

Ендуткина Антона Валентиновича

“РОЛЬ СТРУКТУРЫ ДНК-СУБСТРАТОВ И СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БЕЛКА В ПРОЦЕССАХ УЗНАВАНИЯ И УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ 8-ОКСОГУАНИН-ДНК-N-ГЛИКОЗИЛАЗАМИ ЧЕЛОВЕКА И E. COLI”

на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности
03.01.04 – биохимия.

Актуальность исследования. В своей работе Ендуткин А.В. подробно рассмотрел механизмы действия 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз OGG1 человека и Fpg E. coli. Актуальность работы Ендуткина А.В. не вызывает сомнений. 8-оксогуанин (8-охо-Г) является наиболее распространенным повреждением ДНК, образующимся под влиянием активных форм кислорода и обладающим мутагенными свойствами. Структурные изменения ДНК-гликозилаз, сопровождающие стадии распознавания и отщепления поврежденного основания 8-охо-Г, а также роль нуклеотидного состава и структуры ДНК в этих процессах не достаточно изучены. Исследование молекулярных механизмов репарации 8-охо-Г является актуальным направлением и необходимо для понимания механизмов ответа клеток на окислительный стресс.

Оценка новизны и значимости полученных результатов. Работа представляет собой целостное законченное исследование, последовательно продемонстрировавшее важность структуры ДНК-субстрата, белок-белковых взаимодействий и внутрибелковых взаимодействий в механизме распознавания и отщепления 8-охо-Г эукариотическими и прокариотическими ДНК-гликозилазами.

Работа обладает высокой научной новизной. Большая часть научных результатов была получена автором впервые в мире. Исследование влияния нуклеотидного окружения на стэкинг-взаимодействия с поврежденным основанием и эффективность отщепления 8-охо-Г не имеет аналогов. Энергии коаксиального стэкинга 8-охо-Г для всех вариантов сиквенс-контекста окружения 8-охо-Г:С были определены впервые. Показано, что 8-охо-Г оказывает дестабилизирующее действие на стэкинг не зависимо от сиквенс-контекста ДНК. Продемонстрирована зависимость эффективности удаления 8-охо-Г от локальных конформационных параметров ДНК и сиквенс-контекста окружения 8-охо-Г. Установлено, что фланкирующие 8-охо-Г некомплементарные основания ДНК затрудняют его отщепление. Основные выявленные закономерности влияния структуры ДНК-субстрата на эффективность отщепления 8-охо-Г справедливы как для OGG1, так и для Fpg.

Автором также впервые была продемонстрирована важность целостности сахаро-фосфатного остова ДНК для отщепления 8-охо-G, ДНК-гликозилазой Fpg, и установлена критическая роль фосфатной группы через один нуклеотид с 5'-стороны от 8-охо-G для его удаления.

В работе Ендуткина А.В. было изучено влияние многих ранее не изученных аминокислотных замен в белке Fpg. Проведенное исследование позволило впервые установить важную роль удаленных от активного центра внутрибелковых взаимодействий (остатки R54, E131, Y170) для каталитической активности Fpg. Кроме того, автором впервые были выявлены ДНК-белковые взаимодействия, ответственные за узнавание 8-охо-G. Сделано предположение о том, что мутации остатков активного центра R108, N168, R258 нарушают процесс выворачивания поврежденного нуклеотида при катализе.

Полученные научные результаты обладают высокой научной значимостью. Работа Ендуткина А.В. не только раскрывает детали механизма узнавания и отщепления 8-охо-G ДНК-гликозилазами, но и углубляет общее понимание механизма многостадийной верификации субстратов разными классами ДНК-гликозилаз.

Основное содержание

Диссертация Ендуткина А.В. объемом 140 страниц построена по стандартному плану и включает введение, 3 главы, заключение, выводы и список литературы. Диссертация включает 55 рисунков и 16 таблиц и содержит 371 источник литературы. Обзор литературы очень полно и систематизировано излагает современное состояние проблемы, которой посвящена работа. Содержание диссертационной работы и суть исследования достаточно полно отражены в автореферате.

Оценка достоверности полученных результатов

Автором было проведено глубокое и всестороннее исследование механизмов репарации 8-охо-G OGG1 человека и Fpg *E. coli*. Проведена трудоемкая экспериментальная работа с использованием широкого спектра современных биохимических, биофизических, биоинформатических, и молекулярно-биологических методов. Для вычисления суммарной энергии стэкинг-взаимодействий 8-охо-G с C в разном нуклеотидном окружении был использован метод термической денатурации с оптическим поглощением. При исследовании каталитической активности отщепления 8-охо-G применялись классические методы ферментативной кинетики. Анализ термодинамических и кинетических параметров реакций узнавания и отщепления 8-охо-G был дополнен анализом известных структурных данных и данными компьютерного моделирования, а также анализом влияния мутаций отдельных аминокислотных остатков и структурных доменов на активность 8-охо-G-ДНК-гликозилаз. Мутации ДНК-гликозилаз были получены с помощью сайт-направленного мутагенеза и мутантные белки были выделены с помощью набора хроматографических методов из клеток *E. coli*.

Основные выводы диссертационной работы были сделаны на основе нескольких взаимодополняющих методов исследования. Например, важная роль ДНК-белковых взаимодействий в узнавании 8-охо-G была предсказана в ходе компьютерного моделирования и экспериментально проверена *in vitro*. При исследовании внутримолекулярных белок-белковых взаимодействий Fpg функционально важные взаимодействия были предсказаны биоинформатически методом коэволюции аминокислотных остатков, а затем исследованы биохимически. Для исключения опосредованного влияния аминокислотных замен на каталитическую активность Fpg путем дестабилизации структуры белка автором были исследованы кривые плавления мутантных вариантов методом кругового дихроизма, а для минимизации эффекта денатурации белков их каталитическая активность была измерена при пониженной температуре.

Представленные в работе исследования достоверны, выводы и заключения обоснованы. Результаты диссертационной работы представлены в пяти статьях, в том числе опубликованы в двух работах с первым авторством и одной с равным вкладом в первое авторство, что свидетельствует о значительном личном вкладе автора в проведенное исследование.

Замечания. Работа не лишена некоторых недостатков.

1) Основное замечание касается статистической обработки полученных данных. В материалы и методы не включен раздел, описывающий статистическую обработку результатов, а указание расчета стандартной ошибки и количество повторений есть только для двух таблиц. Для измерений K_m реакций удаления 8-охо-G для субстратов II и III (таблицы 8 и 10), а также для варианта Q234R (таблица 14) ошибки достигают 50% и более. Для измерений свободной энергии в таблице 11 не приведены статистические погрешности. Тем не менее, эти замечания касаются очень небольшого процента измерений и не оказывают влияния на достоверность выводов диссертационной работы.

2) Результаты работы четко и логично изложены в диссертации и автореферате, но можно отметить незначительные замечания в представлении результатов:

- в описании к таблице 8 диссертации и таблице 11 автореферата перепутаны названия субстратов XII и XXI, пропущено название субстрата V,

- на рис. 35 не указана концентрация контрольного препарата полноразмерного белка Fpg,

- в автореферате не хватает схемы структурно-доменной организации OGG1 и Fpg с указанием расположения активного центра, границ доменов и аминокислотных остатков, которые были мутированы,

- пропущены некоторые запятые и слова, есть несколько опечаток.

- в автореферате не даны расшифровки некоторых сокращений (ОДН-субстрат, РСА).

3) В ходе исследований автором была показана остаточная активность С-концевого домена Fpg по расщеплению альдегидного АП-сайта по механизму β -элиминирования. Полноразмерный белок расщепляет сайт по механизму β - δ -элиминирования. В связи с этим возникает вопрос о степени чистоты выделенного препарата С-концевого Fpg. Автор подтвердил отсутствие примесей посторонних белков с помощью окраски геля Кумассии и отсутствие ферментов, взаимодействующих с АП-сайтом, с помощью ДНК-белковых шивков. Тем не менее, чувствительность этих методов для детекции примесей не очень высока, а на геле, окрашенном Кумассии, в области, примерно соответствующей по массе 28-29 кДа, есть слегка различимая полоса. Проводилась ли окраска серебром? Можно ли предположить возможный механизм такой активности в белке, лишенной каталитического центра? Может ли данная активность иметь биологическое значение или это остаточная неспецифическая активность?

В целом перечисленные замечания не снижают очень высокого научного уровня диссертационной работы.

Заключение. Работа представляется актуальной, является законченным научно-исследовательским трудом и выполнена автором самостоятельно на очень высоком научном и методическом уровнях. Диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, так как в ней содержится решение задачи узнавания субстратов ферментами репарации 8-оксогуанина, имеющей значение для развития области репарации ДНК, а ее автор Ендуткин Антон Валентинович заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Обсуждение диссертационной работы состоялось на межлабораторном семинаре группы «Специализированные ДНК-полимеразы» и лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов 16.11.2018.

зав. группой «Специализированные ДНК-полимеразы» ИМГ РАН
к.б.н. Макарова А.В.

зав. лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ИМГ РАН
проф., д.б.н. А.В. Кульбачинский

Подпись Макаровой А.В. и Кульбачинского А.В.
удостоверяю

ученый секретарь

к.б.н. Андреева Л.Б.

