

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Ендуткина Антона Валентиновича на тему: «Роль структуры днк-субстратов и структурных элементов белка в процессах узнавания и удаления повреждений 8-оксогуанин-днк-п-гликозилазами человека и *E. coli*.» по специальности 03.01.04 — «биохимия» на соискание ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация Ендуткина Антона Валентиновича посвящена определению роли структурных элементов в узнавании и механизмах удаления поврежденного основания в комплексах нуклеиновых кислот с белками репарационной системы. В качестве процесса повреждения выбрано окисление гуанина. В качестве белкового компонента ДНК-белковых комплексов выбраны 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилазы значительно эволюционно удаленных друг от друга организмов. Актуальность выбранной темы исследования обусловлена выбором типа модельного повреждения ДНК. 8-оксогуанин в составе ДНК образуется в результате окисления и является наиболее распространенным типом повреждения ДНК в организме, которое появляется в ответ на внешние воздействия или в результате внутренних изменений. Накопление таких повреждений приводит к появлению и накоплению мутаций, а в результате со временем ко многим патологическим изменениям в организме, в частности к опухолевой трансформации клеток. Детальное понимание природных механизмов процессов репарации повреждений ДНК необходимо для разработки средств профилактики предотвращения возникновения патологий или для создания искусственных систем распознавания поврежденной ДНК в диагностических целях. По существующим данным, ДНК-гликозилазы специфичны к достаточно широкому кругу повреждений оснований. Однако специфичность узнавания может зависеть от последовательности ДНК, что особенно важно, например, в случае совпадения с регуляторными областями генома. Экспериментальное исследование механизмов взаимодействий ДНК-гликозилаз с повреждением ДНК в зависимости от окружающего контекста — это **актуальная задача**, решение которой может привести к открытию новых направлений в области понимания онкогенеза.

Структура диссертационной работы классическая. Текст автора состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списков сокращений и цитированной литературы. Текст диссертации изложен на 140 страницах, содержит 55 рисунков и 16 таблиц и включает в себя ссылки на 371 литературных источника. **Введение** отражает цель и задачи диссертационной работы, новизну и практическую значимость, проведенную апробацию работы, содержит задачи,

соответствующие положениям, выносимым на защиту. **Обзор литературы** не имеет общего названия, однако логично связан с темой диссертации и сутью работы. Обзор литературы содержит 6 глав, содержание которых отражает состояние исследований в области диссертационной работы и конкретизирует различия между прокариотическими и эукариотическими 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилазами. **Экспериментальная часть** названа «Материалы и методы». В ней детально описано исследование биохимических свойств рекомбинантных ДНК-гликозилаз, выделение мутантных форм FgpFpg и C- и N- доменов, детально описано получение ДНК-субстратов и методы моделирования взаимодействий. Результаты объединены с обсуждением и представлены 6 главами, характеризующими: 1) влияние структуры ДНК на субстратную специфичность ферментов Fpg E. coli и OGG1 человека, 2) термодинамические параметры стекинга в присутствии 8-оксогуанина, 3) анализ свойств доменов FgpFpg, 4) определение важных внутримолекулярных взаимодействий в FgpFpg, 5) роль выворачивания поврежденных оснований в узнавании ферментами Fpg E. coli, OGG1 человека, 6) влияние целостности сахарофосфатного остова на функционирование FgpFpg. Заключение суммирует результаты работы. **Выводы** сформулированы четко, основаны на экспериментальных данных. Для их получения была использована методология моделирования методами молекулярной динамики природных взаимодействий в ДНК-белковых комплексах в комбинации с экспериментальной проверкой свойств мутантных форм ферментов. Для исследований биохимических свойств ДНК-белковых комплексов *in vitro* были использованы синтезированные олигонуклеотидные ДНК-субстраты различной структуры с модельными повреждениями и чистые препараты рекомбинантных белков. Для описания биохимических свойств 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилаз человека и E. coli использовался комплекс методов ферментативной кинетики, кругового дихроизма, термической денатурации. Эксперименты проводились в нескольких повторениях, определялись интервалы погрешностей измерений, рассчитывались значения возможной ошибки кинетических параметров. Качество экспериментов высокое, что позволяет говорить об обоснованности выводов, сформулированных в диссертации на их основе. Исследование ферментов репарации окислительных повреждений ДНК как из прокариотического организма (Fpg E. coli), так и эукариотического организма (OGG1 человека) позволило делать в диссертационной работе обобщенные выводы о свойствах для этого класса ферментов.

Достоверность и **научная новизна** диссертационного исследования и полученных выводов подтверждается четырьмя высокорейтинговыми публикациями в рецензируемых международных журналах, входящих в первый квартиль. На основе данных,

представленных в диссертационной работе, опубликовано две работы в журнале *Nucleic Acid Research* и одна в журнале *Journal of the American Chemical Society* с импакт-фактором более 10. **Значимость для науки** и практики полученных автором результатов очевидна. Для науки полученные в работе данные – это новая отправная точка понимания механизмов эксцизионной репарации на молекулярном уровне. С точки зрения практики результаты и выводы диссертации могут быть использованы как основа для направленного дизайна домена рекомбинантных белков, узнающих 8-оксогуанин в ДНК. Ферментативные системы с таким узнающим доменом могут быть использованы как для оценки качества выделенных образцов ДНК необходимым, например, перед направленным секвенированием с высоким покрытием на основе технологий нового поколения для определения низкой аллельной фракции мутантной ДНК при исследовании опухолевых поражений, так и для уменьшения ложноположительной детекции присутствия в образце мутаций путем коррекции 8-оксогуанинов в образцах выделенной ДНК. Так для этого может быть использован полноразмерный OGG1 или Fpg, его С-концевой домен, сохраняющий узнающую и ферментативную активность, что было показано в диссертационной работе. В заключении к диссертационной работе отмечено, что исследования в направлении создания метода иммуноферментной детекции повреждений ДНК на основе работы уже проводятся.

Содержание диссертации обладает новизной и является завершенным исследованием. Достоинством работы является разносторонний подход к решению поставленных в работе задач на основе комбинации экспериментальных данных и теоретических методов моделирования взаимодействий. В качестве замечания к представлению части работы «Материалы и методы» можно вынести, что из представленного описания плазмид не ясно как именно они были получены, по каким сайтам проводилась вставка полноразмерного гена, использованного для получения мутантных форм методом сайт-направленного мутагенеза, какой штамм был использован исходно для получения ДНК гена белка Fpg, ведь возможен полиморфизм на уровне исходного гена. Не ясно, подтверждалась ли первичная структура всего гена после проведения сайт-направленного мутагенеза или только места направленного введения мутаций. Во втором варианте, встает вопрос о специфичности эффектов найденных для Arg108, Asn168 и Arg258 в Fpg. В результатах и обсуждении не хватает объяснения выбора длины и суммированного в таблице сравнения ДНК-субстратов (количества типа канонических и не канонических пар, расчетных конформационных параметров), так нельзя соотнести выпавшую на рисунке 25 точку с последовательностью субстрата, также не понятно почему ограничились 21 ДНК-субстратом. Первичные кинетические данные стоило бы привести в качестве приложения к диссертации. Работа содержит

незначительные недостатки оформления. Например, для обозначения повреждения используется 8-оксогуанин и 8-охоGua на одной странице (стр. 3). В целом работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, сделанные выводы обоснованы полученными результатами.

Таким образом, диссертация соискателя Ендуткина Антона Валентиновича является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи о влиянии структуры ДНК, ДНК-белковых и внутримолекулярных взаимодействий в белке на эффективность узнавания и расщепления поврежденной окислением ДНК ДНК-N-гликозилазами. Решение этой задачи имеет значение для понимания репарационных процессов. В работе изложены новые научно обоснованные выводы, имеющие существенное значение для развития биохимии как области знаний, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 03.01.04 — биохимия.

Официальный оппонент, д.х.н., доцент кафедры

химии природных соединений, заместитель декана

по научной работе Химического факультета

Химического факультета 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3,

ГСП-1.

Телефон, e.mail оппонента:

+7(495)9391598, mzvereva@chem.msu.ru

М.Э.Зверева

Подпись сотрудника Химического факультета Химического факультета Зверевой М.Э. заверяю.

и.о.декана Химического факультета,

д.х.н., чл.-корр. РАН, профессор

30 ноября 2018 г.



С.Н. Калмыков