

ОТЗЫВ

официального оппонента Вейко Натальи Николаевны

на диссертационную работу

АБРОСИМОВОЙ ЛЮДМИЛЫ АЛЕКСЕЕВНЫ

«Гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции *BspD6I* и конъюгаты гомодимерной эндонуклеазы рестрикции *SsoII* с олигодезоксирибонуклеотидами: особенности взаимодействия с ДНК», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия

Актуальность исследования

Бактериальные ферменты, входящие в системы рестрикции-модификации, постоянно находятся в центре внимания исследователей, поскольку играют ключевую роль в процессе поддержания целостности генома микроорганизмов. Эндонуклеазы рестрикции (ЭР) являются также незаменимыми инструментами генетической инженерии. Эти ферменты используются при создании высокоспецифичных эндонуклеаз, способных вносить разрыв в строго определенную последовательность в геноме. В диссертационной работе Абросимовой Л.А. исследованы два фермента: гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции *BspD6I* и гомодимерная эндонуклеаза рестрикции *SsoII*. Большая субъединица ЭР *BspD6I* способна в изолированном виде гидролизовать одну из цепей ДНК-дуплекса и поэтому также является никующей эндонуклеазой (НЭ). Функциональная организация ЭР *BspD6I* до конца не выяснена. Неизвестен механизм взаимодействия этого фермента с субстратом. Биохимические свойства гомодимерной ЭР *SsoII* были детально охарактеризованы ранее. Однако, практически не изучена возможность «переключения» активности фермента под действием различных регулируемых внешних факторов. Таким образом, исследование Абросимовой Л.А., в котором рассмотрены особенности взаимодействия с ДНК двух ферментов - ЭР своевременно и актуально.

Научная новизна результатов исследования

В диссертационной работе Абросимовой Л.А. впервые проведено комплексное исследование свойств НЭ *BspD6I*, в том числе особенностей ее взаимодействия с ДНК и малой субъединицей ЭР *BspD6I*. Следует отметить, что на сегодняшний день данных рентгеноструктурного анализа об организации комплекса ЭР *BspD6I* с ДНК-дуплексом не имеется. Поэтому полученные и проанализированные Абросимовой Л.А. результаты могут являться основой для построения уточненной модели комплекса ЭР *BspD6I* с ДНК. Продемонстрировано влияние большой и малой субъединиц фермента на функционирование друг друга. Показано, что большая субъединица *BspD6I* индуцирует изгиб ДНК при

связывании с субстратом. Впервые обнаружено влияние ненуклеозидной вставки (остаток азобензола) в различных положениях последовательности -лиганда на функционирование VspD6I. Впервые предложен способ воздействия на ферментативную активность НЭ VspD6I за счет изменения температуры реакции.

Впервые были получены конъюгаты ЭР SsoII с различными самокомплементарными олигодезоксирибонуклеотидами, которые селективно присоединены к димеру мутантной формы SsoII в непосредственной близости от ДНК-связывающего центра фермента. Показана принципиальная возможность обратимого «переключения» активности фермента при изменении температуры реакции.

Практическое значение работы

Данные о свойствах VspD6I и конъюгатов SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами, полученные в работе Абросимовой Л.А. найдут применение при конструировании ферментов с принципиально новыми характеристиками, а также при создании химерных нуклеаз, где в качестве ДНК-гидролизующего модуля могут выступать ферменты НЭ. Создание таких новых конструкций крайне необходимо для успешного развития ряда областей биомедицины и биотехнологии.

Разработанный автором подход для модулирования активности гомодимерной ЭР SsoII с помощью температуры может быть применен в других биологических системах для воздействия на активность белков, связывающих субстрат в полости.

Все результаты работы Абросимовой Л.А., несомненно, будут востребованы в современных молекулярно-биологических и биомедицинских исследованиях.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Абросимовой Л.А. построена традиционным образом и состоит из введения и трех глав: обзора литературы, обсуждения полученных результатов и экспериментальной части.

Во введении убедительно обоснована актуальность выбранной темы, ее научная новизна и практическая значимость, четко определены задачи, полностью отражающие поставленную цель.

Глава 1. Обзор литературы (144 ссылки) является необходимой вводной частью к работе и непосредственно связан с темой диссертации. Автор подробно описывает встречающиеся в природе НЭ и ЭР, способы конструирования искусственных НЭ. Особое внимание уделено областям практического применения сайт-специфических НЭ, что дает представление о востребованности этих ферментов в современной молекулярной биологии. В обзоре литературы подробно описаны типы и способы создания высокоспецифичных эндонуклеаз, используемых при редактировании генома. Заключительная часть обзора посвящена конструированию сайт-специфичных эндонуклеаз с регулируемой активностью,

что имеет прямое отношение к основным результатам диссертационной работы. Обзор литературы, собранной и обобщенной Абросимовой Л.А, будет полезен широкому кругу ученых, работающих в области ДНК-белковых взаимодействий и разрабатывающих подходы для создания белков с контролируемой активностью.

Глава 2. Первой частью диссертационной работы Абросимовой Л.А. являлась фундаментальная характеристика свойств ЭР VspD6I и изучение особенностей ее взаимодействия с ДНК. В разделе 2 впервые показано, что НЭ VspD6I способна изгибать субстрат при связывании. Для анализа взаимодействия фермента с ДНК были использованы три группы синтетических ДНК-дуплексов: немодифицированные, метилированные и дуплексы, содержащие ковалентно присоединенный азобензол. Были впервые описаны: взаимосвязь между двумя субъединицами фермента, взаимодействие ЭР VspD6I с субстратом и продуктом реакции гидролиза, возможные ДНК-белковых контакты. Раздел 3 посвящен разработке подходов к регулированию активности НЭ VspD6I с использованием модифицированных ДНК-дуплексов. Используемые при выяснении контактов фермента с ДНК азобензолсодержащие дуплексы были протестированы на их способность ингибировать активность НЭ VspD6I. В работе подобраны ингибиторы НЭ VspD6I оптимальной структуры, позволяющие при их добавлении в реакционную смесь регулировать активность фермента за счет изменения температуры реакции.

Вторая часть работы Абросимовой Л.А. связана с конструированием и изучением каталитических свойств конъюгатов ЭР SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами. Автор применил большой набор модифицированных олигонуклеотидов для ковалентного присоединения к димеру ЭР SsoII (13 структур, табл.2.5). Выбор каждого из модифицированных олигонуклеотидов был теоретически обоснован путем моделирования структуры форм белка и его конъюгатов с помощью программы Accelrys DS Visualizer. Была проанализирована температурная устойчивость всех модельных комплексов. Исходно автор предположил, что скорость ферментативного гидролиза возможно модулировать путем УФ-облучения. Была проведена обширная серия экспериментов. Однако ни для одного из полученных конъюгатов не удалось продемонстрировать зависимость скорости гидролиза ДНК от облучения УФ-светом. Тем не менее, была показана возможность «выключения» активности ЭР SsoII в составе конъюгата и дальнейшее восстановление гидролитической активности при нагревании до 45°C. Идея ковалентного присоединения ДНК к поверхности белка в качестве препятствия для связывания субстрата является оригинальной и перспективной и, по-видимому, может быть применена к другим белкам, связывающим субстрат внутри белковой глобулы.

Раздел «Результаты и обсуждение» представлен в удобном для прочтения виде и хорошо иллюстрирован. В каждом подразделе автор не только обсуждает полученные результаты, но и сопоставляет их с литературными данными, делает логические заключения.

Глава 3. Экспериментальная часть написана автором тщательно и подробно, возможность воспроизведения любой представленной методики не вызывает сомнений.

Имеются замечания, не влияющие на общую положительную оценку работы и носящие скорее рекомендательный характер.

1. Как уже было отмечено в отзыве, одним из достижений автора является демонстрация наличия изгиба ДНК в комплексе с НЭ BspD6I. Однако при обсуждении влияния введения остатка азобензола в позиции, сближенные с участком узнавания фермента, не обсуждается возможное влияние модификации на угол изгиба ДНК, что также может быть причиной наблюдаемых изменений ферментативной активности. По-видимому, при дальнейшем развитии работы автор учтет это замечание.

2. Возможно, термин "обратимый процесс" не совсем подходит для системы, в которой переключение активности наблюдается только на протяжении двух циклов. Имеется ввиду переключение активности ДНК-белковых конъюгатов эндонуклеазы рестрикции SsoII с олигонуклеотидами при изменении температуры. Желательно также, чтобы автор дал более детальные пояснения относительно того, почему процесс затухает через 2 цикла и высказал соображения о том, возможно ли, каким-то образом, стабилизировать этот процесс? Дальнейшая разработка этого интересного феномена имеет большое теоретическое и практическое значение.

3. Хотелось бы уточнить условия реакции гидролиза ДНК под действием НЭ BspD6I в присутствии азобензолсодержащих дуплексов, описанной на стр. 108. Почему необходимо было проводить контрольные эксперименты в темноте, учитывая, что при видимом свете *транс*-конфигурация азобензола также не способна переходить в *цис*-конфигурацию?

Степень обоснованности и достоверности полученных научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Указанные недостатки не снижают общей высокой оценки диссертационной работы Абросимовой Л.А. Обоснованность научных положений, сформулированных в диссертации, обусловлена достаточным объемом современных методов исследования, обеспечивающим статистически значимые положения и выводы. Высказанные предположения и гипотезы, несомненно, могут быть использованы в областях биоорганической химии и молекулярной биологии, изучающих ДНК-связывающие белки и ферменты. Работа хорошо оформлена и практически не содержит опечаток. Высокая надежность полученных Абросимовой Л.А. результатов достигнута сочетанием различных молекулярно-биологических подходов. Все результаты получены впервые автором исследования и опубликованы в 4 российских и зарубежных изданиях. Результаты были представлены на 7 международных и российских конференциях. В опубликованных научных работах и автореферате основные результаты

диссертации, положения и выводы изложены в полной мере. В целом работа заслуживает самой высокой оценки.

Заключение

Диссертационная работа Абросимовой Людмилы Алексеевны «Гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции BspD6I и конъюгаты гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами: особенности взаимодействия с ДНК» является законченным научно-квалификационным трудом. В нем на основании выполненных автором исследований сформулированы и обоснованы научные положения, которые могут быть квалифицированы как решение актуальной научной задачи. По объему проведенных исследований и полученным результатам диссертационная работа Абросимовой Л.А. полностью удовлетворяет требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Автор работы Абросимова Людмила Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Медико-генетический научный центр РАМН».

Вейко
Наталья Николаевна Вейко

10 февраля 2017 г.

Подпись Вейко Н.Н. заверяю,
Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Медико-генетический научный центр РАМН».

Кандидат медицинских наук

10 февраля 2017 г.



Екатерина Сергеевна Воронина

Почтовый адрес:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр РАМН», 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1.

E-mail: ribgene@rambler.ru