

**ОТЗЫВ**  
**официального оппонента Пышного Дмитрия Владимировича**  
**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.

Эндонуклеазы рестрикции (ЭР) – группа ферментов, узнающих специфические последовательности в двуцепочечных ДНК и вносящих разрыв в углеводофосфатный остов в каждой цепи ДНК в строго детерминированных положениях вблизи участков связывания. Данная разнородная группа ферментов представляет значительный интерес, в первую очередь, в связи с их крайне высокой востребованностью в современной научно-исследовательской и биотехнологической практике. В последние годы просматривается тенденция к резкому возрастанию интереса исследователей к особой подгруппе эндонуклеаз рестрикции, к так называемым никующим эндонуклеазам («никазам», НЭ) – ферментам, специфично гидролизующим лишь одну цепь в двуцепочечной ДНК. Такие ферменты, наряду с классическими ЭР, позволяют в значительной степени расширить возможности при манипулировании с нуклеиновыми кислотами, создавая на их основе новые генетические конструкции для синтетической биологии, компоненты диагностических систем, систем направленного воздействия на генетический материал и его коррекции. Одним из существенных ограничений при создании новых эндонуклеаз рестрикции и, в частности, никующих эндонуклеаз, является отсутствие достаточной информации о пространственной организации и топологии белково-нуклеиновых контактов в структуре соответствующих фермент-субстратных комплексов. В этой связи работа Абросимовой Л.А., посвященная детальному изучению особенностей ДНК-направленного действия как субъединиц гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции BspD6I, так и конъюгатов олигонуклеотидов с гомодимерной эндонуклеазой рестрикции SsoII, несомненно, является актуальным исследованием.

Конкретной целью представленной работы было «получение новой информации о функционировании гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции, одна из субъединиц которых является никующей эндонуклеазой (на примере ЭР BspD6I), конструирование и изучение свойств конъюгатов гомодимерных эндонуклеаз рестрикции с ДНК-фрагментами (на примере ЭР SsoII), а также модулирование активности этих ферментов для расширения границ их практического использования».

В работе решались следующие группы задач:

1. было необходимо охарактеризовать свойства эндонуклеазы рестрикции BspD6I и выявить особенности ее взаимодействия с ДНК-фрагментами, как немодифицированными, так и модифицированными;
2. предложить подход для направленного регулирования активности никующей эндонуклеазы BspD6I с использованием синтетических ДНК-дуплексов;
3. сконструировать конъюгаты ЭР SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами и изучить способность таких конъюгатов гидролизовать ДНК в различных условиях.

Структура диссертационной работы Абросимовой Л.А. традиционна и состоит из оглавления, списка используемых сокращений, введения, обзора литературы, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части и выводов. Представленный список цитируемой литературы содержит 202 ссылки. Работа достаточно хорошо иллюстрирована и содержит 91 рисунок, 3 схемы и 11 таблиц.

Во введении автор обозначает место выполненного ею исследования в ряду современных работ соответствующего профиля и формулирует цели и задачи.

Обзор литературы описывает спектр работ по теме «Конструирование искусственных никующих эндонуклеаз и их использование в генетической инженерии». В обзоре дано довольно подробное описание классификации встречающихся в природе эндонуклеаз рестрикции и никующих эндонуклеаз. В первой части обзора литературы представлены подходы к конструированию искусственных никующих эндонуклеаз: путем нарушения димеризационного интерфейса эндонуклеаз рестрикции; на основе гомодимерных эндонуклеаз рестрикции, содержащих один каталитический центр; с помощью мутагенеза генов эндонуклеаз рестрикции, в том числе, «хоуминг»-эндонуклеаз. Другие части обзора литературы посвящены описанию способности эндонуклеаз рестрикции стимулировать матрично-независимый синтез ДНК; анализа спектра современных применений эндонуклеаз рестрикции и, в частности, никующих эндонуклеаз в области нанобиотехнологий, геной инженерии, молекулярной диагностики ДНК и РНК, в том числе, в системах амплификации аналитического сигнала, а также для картирования ДНК. Абросимова Л.А. убедительно демонстрирует современные тенденции в области создания новых высокоспецифичных эндонуклеаз рестрикции. Описаны основные принципы действия и способы конструирования эндонуклеаз, способных распознать и расщеплять в ДНК уникальные (в рамках геномов) последовательности. Отдельное

внимание обращено на принципы конструирования ЭР, активность которых регулируется в ответ на внешние стимулы, например, световое воздействие или изменение температуры.

В целом обзор данных литературы убедительно демонстрирует актуальность проведенного Абросимовой Л.А. исследования и дает довольно полное представление о широчайшей области работ по созданию молекулярных инструментов и потенциальных терапевтических агентов на основе эндонуклеаз рестрикции. В тоже время, обзор доказывает и актуальность заявленных автором конкретных задач. Уверен, что приложении незначительных редакционных усилий для доработки текста, представленное в работе описание данных литературы может быть опубликовано в виде обзорной статьи.

Рассматривая главу, посвященную обсуждению полученных Абросимовой Л.А. результатов, следует, в первую очередь, отметить, что автором выполнено огромное по объему экспериментальной работы и многоплановое исследование. Основным «инструментарием» исследования стал арсенал рационально сконструированных наборов нативных и модифицированных олигонуклеотидов и комплексов на их основе, а также набор протяженных фрагментов двуцепочечных ДНК (дцДНК), содержащих участки специфического связывания исследуемой эндонуклеазы рестрикции. Кроме того, смелое использование автором широкого спектра различных методов и экспериментальных приемов позволило получить новые данные, имеющие принципиальное значение как для понимания организации изученных белково-нуклеиновых комплексов, так и для разработки принципов направленного регулирования активности классических и никующих эндонуклеаз.

Работа имеет характер многостадийного поискового исследования, описывающего детали взаимодействия выбранных автором эндонуклеаз с ДНК субстратами. Обсуждению полученных результатов предшествует вводный подраздел, дающий детальное описание имеющейся до начала работы информации о белковых объектах исследования – термофильной гетеродимерной эндонуклеазы *BspD6I* и мезофильной гомодимерной эндонуклеазы *SsoII*. Это значительно упрощает осознание плана проводимых исследований и обуславливает выбор модельных систем.

Первая часть работы посвящена изучению особенностей действия гетеродимерной эндонуклеазы *BspD6I* (ее большой и малой субъединиц) с различными субстратами ДНК. В ходе исследования впервые доказано, что никующая эндонуклеаза *BspD6I* при связывании со специфическим участком в дцДНК вызывает локальный изгиб двойной спирали (угол изгиба ~ 66°). Установлено строение «оптимального» ДНК-субстрата для связывания *Nt.BspD6I*. Доказано, что большая и малая субъединицы ЭР *BspD6I* проявляют большую активность при совместном связывании с ДНК-субстратом. С использованием

серии модельных ДНК-субстратов, несущих ненуклеозидные вставки в различных положениях относительно участка связывания фермента в ДНК, показана возможность изменения как направления гидролитического действия эндонуклеазы, так и ее активности. Применение модифицированных ДНК позволило не только охарактеризовать топологию фермент-субстратных взаимодействий, но и выявить возможные «области контакта» большой и малой субъединиц ЭР VspD6I с дцДНК-субстратом. Получены дцДНК, являющиеся конкурентными ингибиторами этой эндонуклеазы рестрикции. Продемонстрирована принципиальная возможность использования такого типа нерасщепляемых олигонуклеотидных дуплексов в качестве регуляторов активности эндонуклеаз под действием температуры. Следует отметить, что, используя ненуклеозидную вставку на основе производного азобензола, изначально автор планировал создать фоторегулируемые дуплексы-субстраты. Однако в результате проведенных исследований продемонстрировать влияние фотоиндуцируемых эффектов структурных перестроек субстрата на активность исследуемых нуклеаз автору не удалось.

Важной частью работы Абросимовой Л.А. стало детальное физико-химическое изучение комплексообразования никующей эндонуклеазы VspD6I с ДНК-субстратами. Данный этап работы был выполнен с применением различных экспериментальных методов и в условиях, обеспечивающих возможность связывания фермента с ДНК, но предотвращающих реализацию его гидролитической активности. Доказано, что введение ненуклеозидных вставок рядом с участком связывания фермента с ДНК незначительно сказывается на сродстве НЭ VspD6I к специфической ДНК, но, в тоже время, может кардинально влиять на эффективность направленного гидролиза ДНК. Особое внимание заслуживает часть работы, описывающая взаимодействие ЭР VspD6I с субстратом, содержащим остатки N6-метилированного аденозина. Убедительно показано, что введение даже столь маленькой модификации(й) в участок узнавания значительно влияет на гидролитическую активность исследуемой эндонуклеазы рестрикции и в меньшей степени отражается на ее связывании с ДНК.

В заключительной части исследования Абросимова Л.А. впервые показала, что самокомплементарные олигонуклеотиды, селективно введенные в заданные положения димера мутантной формы эндонуклеазы рестрикции SsoII и в непосредственной близости от его ДНК-связывающего центра, блокируют гидролиз субстрата при комнатной температуре (25°C). Показано, что эффективность гидролиза субстрата таким ДНК-белковым конъюгатом может значительно возрастать при повышении температуры. Кроме того, убедительно доказано, что изменение активности конъюгата эндонуклеазы рестрикции SsoII с олигодезоксирибонуклеотидом в режиме термоциклирования (интервал

от 25 до 45°C) повторяется, по крайней мере, в течение двух циклов нагревания/охлаждения.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, так как они хорошо аргументированы и подтверждены экспериментальными данными, полученными с использованием современных исследовательских подходов и методов. Диссертация Абросимовой Л.А. является законченным научным исследованием, выполненным автором самостоятельно на высоком экспериментальном и теоретическом уровне. Полученные результаты убедительны и опубликованы в 4 статьях, включая обзорную, и представлены на целом ряде международных конференций.

Принципиальных замечаний к работе Абросимовой Л.А. нет. Объем диссертационной работы довольно большой, поэтому не обошлось без ряда досадных опечаток и неточностей. К наиболее типичным неточностям можно отнести использование в экспериментальной части работы круглых скобок, вместо квадратных, при обозначении ссылок на источники литературы.

Несколько затруднило восприятие материала отсутствие символа, обозначающего наличие концевой 5'-фосфата в продуктах гидролиза, представленных, например, на схемах (стр. 73). Так же неясно, например, на стр. 103, 106 и 111 содержали ли составные дуплексы 5'-фосфатные остатки на стыках дуплексных структур в комплексах VII-B, XII и VII-F соответственно. Соответствующие символы «р» просто были опущены или же все указано верно, т.е. использовались олигонуклеотиды, лишённые 5'-фосфатных групп?

В представленном списке цитированной литературы ссылка № 53 дана для англоязычного варианта публикации, хотя оригинальный источник опубликован в русскоязычном журнале «Биоорганическая химия».

При анализе данных, описанных в разделе 2.2.4.2 (стр. 96-100), осталось не вполне ясно, как автор доказывала строение продуктов гидролиза дуплексов со вставками на основе азобензола. В таблице 2.3 строго указаны позиции гидролиза (стр. 99). Однако столь однозначные результаты невозможно получить из анализа рисунка 2.34 (стр. 97). Были ли использованы дополнительные методы для подтверждения структуры продуктов ферментативного гидролиза?

В разделе 2.2.4.1. (стр. 94) автор указывает, что температура плавления дуплекса ( $T_{пл}$ ) – это температура, при которой доля дуплексной структуры в растворе равна 0,5, что отражено на кривых плавления в интегральной форме. В экспериментальной части (стр.

142) в противовес указано, что за  $T_{пл}$  принимали температуру максимума дифференциальной кривой плавления, а это разные величины. Анализ экспериментальных данных указывает, что именно последний подход и был использован в работе.

В качестве пожелания к дальнейшему развитию работы хотелось бы видеть разработку экспериментального подхода, позволяющего относительно просто продемонстрировать реорганизацию структуры азобензол-содержащих дуплексов ДНК под действием световых стимулов. Кроме того, автору следовало бы указать, при каких параметрах (например, мощность излучения) источника света с длиной волны 365 нм производилось облучение образцов. Без данной информации трудно оценить достаточность/недостаточность оказанного на образец внешнего воздействия.

В автореферате было бы уместно вкратце дать информацию об использованных буферных условиях для проведения ферментативных реакций (наличие катиона магния) и для анализа равновесного связывания субстрата без реализации катализа (наличие катионов кальция).

Указанные замечания не снижают общего хорошего впечатления о работе.

Экспериментальная часть работы подробно описывает использованные в экспериментах материалы и методы. Видно, что автор работы является высококвалифицированным специалистом, хорошо владеющим широким спектром современных методов из областей биоорганической химии, молекулярной биологии и даже биотехнологии.

Выводы работы соответствуют полученным результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации. Таким образом, диссертационная работа Абросимовой Людмилы Алексеевны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пункте 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями, внесенными Постановлениями Правительства РФ №723 от 30.07.2014 г. и №335 от 21.04.2016 г.). В диссертации Абросимовой Л.А. содержится решение задачи по разработке подходов к направленному регулированию активности ряда эндонуклеаз рестрикции с использованием синтетических фрагментов ДНК, что имеет большое значение для развития биоорганической химии. В этой связи считаю, что

Абросимова Л.А., безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Официальный оппонент,  
доктор химических наук, член-корреспондент РАН,  
заведующий лабораторией биомедицинской химии,  
заместитель директора по научной работе  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки «Институт химической  
биологии и фундаментальной медицины»  
Сибирского отделения РАН

  
Pyshnyi D.V.  
09 февраля 2017 г.  


Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения  
Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН),  
630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 8  
Тел. +7 (383) 363-51-51  
E-mail: pyshnyi@niboch.nsc.ru

Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук  
Подпись Лопаткин А. В.  
Заверяю  
Нач. отдела кадров Тарасов В. И.

09.02.2017

