

ОТЗЫВ

на автореферат Абросимовой Людмилы Алексеевны

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

Диссертационная работа Абросимовой Л.А. посвящена исследованию функционирования эндонуклеаз рестрикции (ЭР), одного из наиболее важных для жизнедеятельности клетки класса ферментов систем рестрикции-модификации. Ферменты этого класса представляют собой огромное разнообразие, как по аминокислотной последовательности, так и по структурно-функциональной организации. Их функция состоит в узнавании в двуцепочечной ДНК специфической последовательности и гидролизе обеих цепей ДНК в строго определенном положении относительно участка узнавания.

Успешное решение поставленной задачи, проливающее свет на особенности функционирования ЭР с разной структурно-функциональной организацией, стало возможным благодаря грамотному подходу автора диссертации к выбору методов и объектов исследования: гетеродимерной ЭР BspD6I и гомодимерной ЭР SsoII, а также применению большого числа ДНК-дуплексов разной длины и с разными модификациями. Так, используя в качестве объекта исследования большую субъединицу гетеродимерной ЭР BspD6I, которая является самостоятельной никующей эндонуклеазой (НЭ), на ДНК-дуплексах разной длины автор впервые показал, что для их эффективного гидролиза достаточно наличие 2 пар нуклеотидов (п.н.) с 5'-конца от участка узнавания и 3 п.н. в направлении 3'-конца от места гидролиза. Кроме того, определена оптимальная длина ДНК-дуплекса (26 и 30 п.н.) для эффективного связывания фермента с субстратом. Эти результаты демонстрируют важность взаимосвязи структуры и функции при взаимодействии молекул белка с ДНК.

Особую значимость представляют результаты исследования взаимодействия НЭ BspD6I с дуплексом, несущим расщепляемую связь, и с дуплексом, имитирующим продукт гидролиза. Сочетание данных метода «торможения» в геле и метода акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре позволило автору однозначно показать, что НЭ BspD6I связывается с обоими дуплексами, но с разными скоростями. Равновесная константа диссоциации комплекса НЭ BspD6I с фрагментом ДНК, имитирующим продукт гидролиза, примерно в 2 раза выше. Естественно, в клетке эти процессы идут со значительно большими скоростями, чем в модельной системе, тем не менее, кинетические данные делают картину взаимодействия НЭ BspD6I с дуплексом более понятной.

Поскольку в состав гетеродимерной ЭР BspD6I помимо большой субъединицы НЭ BspD6I входит и малая субъединица (МС BspD6I), вносящая разрыв в нижнюю цепь ДНК на расстоянии 5 п.н.(10%), так и 6 п.н.(90%) с 5'-конца от участка узнавания, то для понимания полной картины взаимодействия ЭР BspD6I с ДНК необходимо было также исследовать функционирование МС BspD6I. Известно, что малая субъединица в изолированном состоянии не гидролизует ДНК, а только в комплексе с большой субъединицей, связанной с ДНК. Для исследования влияния МС BspD6I на активность НЭ BspD6I был изучен гидролиз 26-звенного ДНК-дуплекса только НЭ BspD6I и в присутствии МС BspD6I. Эксперименты показали, что начальная скорость гидролиза возрастает в 2 раза в присутствии 12-кратного избытка МС BspD6I. Это может свидетельствовать о том, что диссоциация НЭ BspD6I из комплекса с дуплексом с разрывами в обеих цепях происходит быстрее, чем из комплекса с дуплексом с одноцепочечным разрывом. Эти результаты коррелируют с кинетическими данными, полученными автором акустическим методом на 30-звенном ДНК-дуплексе, имитирующем продукт гидролиза большой субъединицей. Возможно, при разрывах в обеих цепях дуплекса меняется его конформация, а, следовательно, и контакты с белком,

что и приводит к диссоциации комплекса. К диссоциации комплекса может приводить и изменение угла изгиба ДНК-дуплекса в участке узнавания, который, по утверждению автора, является важным для образования комплекса белка с ДНК. Влияние изменений в участке узнавания ДНК-дуплекса на ферментативную активность НЭ BspD6I и MC BspD6I было ярко продемонстрировано на ДНК-дуплексах с нуклеозидной вставкой на основе D-треонинола с азобензольной группой. Чем ближе положение азобензольной вставки к участку узнавания, тем больше эффект.

Очень привлекательной оказалась идея автора использовать для регулирования активности НЭ BspD6I негидролизующие, азобензолсодержащие ДНК-дуплексы, которые изменяли свою стабильность при повышении температуры, что приводило к диссоциации комплекса и восстановлению активности фермента. Использование в качестве модельного белка гомодимерной эндонуклеазы SsoII (ЭР SsoII) с другой структурно-функциональной организацией позволило автору применить для регулирования активности этого фермента принципиально отличающийся подход: метод «молекулярных ворот». На основании глубокого анализа структуры ЭР SsoII и механизма ее функционирования автором были профессионально подобраны по размеру и составу фрагменты ДНК и реагент, с помощью которого была проведена модификация дуплексов и получены конъюгаты с ЭР SsoII. Использование в конъюгатах самокомплементарных олигонуклеотидов позволило регулировать активность ЭР SsoII, изменяя температурный режим реакции. Этот подход может быть широко использован в молекулярной биологии для регулирования активности ферментов с целью расширения границ их практического использования.

В качестве замечания можно указать отсутствие объяснения, почему автор в своих исследованиях использовал два базовых ДНК-дуплекса (26- и 30-звенный), хотя они практически не отличаются по свойствам, а не один из них.

Результаты исследования НЭ BspD6I и конъюгатов ЭР SsoII представляют большой интерес не только своей новизной, а в первую очередь их интерпретацией в связи со структурой и функциональными свойствами эндонуклеаз. Работа Абрисимовой Л.А. на тему «Гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции BspD6I и конъюгаты гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами: особенности взаимодействия с ДНК» выполнена на высоком профессиональном уровне с использованием самых современных методов в молекулярной биологии и биохимии. Несомненно, диссертация соответствует требованиям пункта 9 «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, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Старший научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН»,
кандидат химических наук

Р.И. Артюх

1 февраля 2017 г.

Почтовый адрес: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, д. 3.
Тел. +7 (4967) 73-11-59, e-mail: artuykh@iteb.ru



УДОСТОВЕРЯЮ - ЗАВ. КАБ. П.Ч.
Е.Е. ГРУЗДЕВА