

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Тюгашев Тимофей Евгеньевич

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Репарация окислительных повреждений ДНК 8-оксогуанин-ДНК-
гликозилазой hOGG1 и аденин-ДНК-гликозилазой MutY

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.04 Биохимия

Новосибирск - 2018

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

ДНК, кодирующая генетическую информацию, постоянно подвергается воздействию различных факторов, таких как ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, окисляющие и алкилирующие агенты и другие агрессивные соединения, некоторые из которых образуются в ходе нормальной жизнедеятельности клетки. Воздействие данных агрессивных факторов провоцирует непрерывное образование тысяч повреждений различной природы, представляющих опасность для нормальной жизнедеятельности живых организмов.

Тип повреждения определяется природой агрессивного фактора, вызвавшего его образование: УФ-излучение приводит к образованию тиминовых димеров, ионизирующее излучение – одноцепочечных и двухцепочечных разрывов ДНК, воздействие алкилирующих агентов вызывает образование аддуктов и межцепочечных сшивок, а активные формы кислорода (АФК) окисляют азотистые основания. Большинство этих повреждений удаляются сложносоставными консервативными системами репарации.

Удаление малообъемных повреждений ДНК, таких как модифицированные (алкилированные, дезаминированные, окисленные) азотистые основания ДНК и апуриновые/апиримидиновые сайты производится эксцизионной системой репарации. Ключевым шагом данного пути репарации является распознавание и удаление повреждения специфической гликозилазой с образованием апуринового/апиримидинового сайта, либо одноцепочечного разрыва. Впоследствии АП-сайты специфически узнаются АП-эндонуклеазами, катализирующими разрыв рибозофосфатного остова. Далее производится репарация одноцепочечного разрыва.

Образование 8-оксогуанина путем окисления азотистого основания гуанина является одним из наиболее распространенных повреждений ДНК, которое при репликации ДНК с высокой вероятностью приводит к образованию хугстиновской пары оснований 8-оксогуанин—аденин, что в итоге приводит к замене пары гуанин—цитозин на пару тимин—аденин. В клетках эукариот ферментами, производящими удаление данного поврежденного нуклеотида, выступают 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы семейства OGG, в организме человека представленные ферментом hOGG1. Если же удаление повреждения не состоялось до момента репликации, то удаление аденина из пары с 8-оксогуанином производится аденин-ДНК-гликозилазой MutY, которая также способна удалять аденин из пары гуанин—аденин. Таким образом, принадлежащие к суперсемейству HhH-GPG ДНК-гликозилазы hOGG1 и MutY катализируют репарацию ДНК в ходе последовательных этапов процесса репликации.

Цель настоящей работы состояла в установлении кинетического механизма действия фермента MutY *E. coli* в процессе репарации ДНК; изучении мутантных форм белка, предположительно обладающих АП-лиазной активностью вследствие замены ключевых аминокислот активного центра; уточнение роли отдельных аминокислот активного центра фермента hOGG1 в распознавании и удалении повреждения.

В ходе работы решались следующие задачи:

- Исследовать конформационные изменения белка MutY дикого типа при взаимодействии как со специфическими, так и неспецифическими ДНК-субстратами методом остановленной струи путем регистрации изменения интенсивности и анизотропии флуоресценции остатков триптофана в составе фермента и флуоресцеиновой метки в составе субстрата.
- Изучить способность проявления мутантными формами MutY S120K и A124K гликозилазной и АП-лиазной активности.
- Установить роль отдельных аминокислот активного центра фермента hOGG1 во взаимодействии с субстратной ДНК методами молекулярной динамики (МД) и сопоставить результаты МД с ранее полученными экспериментальными данными для различных мутантных форм этой гликозилазы.

Результаты

- Методами остановленной струи в сочетании флуоресцентной спектроскопией произведены наблюдения конформационных переходов в молекулах фермента и ДНК в ходе взаимодействия ДНК-гликозилазы MutY с рядом специфических и неспецифических субстратов. Для каждого исследованного процесса определены минимальные кинетические схемы и рассчитаны значения констант скорости реакций, соответствующих данным схемам.
- Исследована активность мутантных форм S120K и A124K
- Методами молекулярной динамики исследована роль отдельных аминокислотных остатков в составе фермента hOOG1, установлено влияние замен аминокислот R154A, R204A, Y203A на образование контактов фермент-ДНК, замен K249A, D268A, G42S на конформацию активного центра фермента и дискриминацию между поврежденным и неповрежденным основанием.

Содержание работы

Предстаационарная кинетика взаимодействия WT MutY с 8-охоG/A-содержащей ДНК

В ходе взаимодействия фермента MutY с ДНК-субстратом, содержащим пару 8-охоG/A, проводилась регистрация изменений интенсивности флуоресценции остатков триптофана белка, флуоресцеина, присоединенного к олигонуклеотиду и анизотропии флуоресценции флуоресцеина. Изменения интенсивности флуоресценции триптофана (Рис. 1А) показывают трехстадийный процесс взаимодействия фермента с субстратом, в котором быстрое первоначальное снижение интенсивности флуоресценции, описываемое двумя кинетическими стадиями, отражает процесс узнавания и связывания белка с ДНК-дуплексом, а во время третьей стадии, характеризуемой небольшим увеличением интенсивности флуоресценции, происходит удаление основания, что согласуется с данными кинетики накопления продуктов взаимодействия полученными с помощью радиоавтографии ПААГ, которая демонстрирует выход значения количества продукта реакции на плато в первые 20 с после начала реакции; быстрое накопление ДНК-продукта не позволяет использовать этот метод для получения численной оценки скорости каталитической реакции, но позволяет оценить концентрацию активной формы фермента. и показывает, что диссоциация фермент-продуктного комплекса является лимитирующей стадией реакции.

Наблюдение за изменениями интенсивности и анизотропии флуоресценции остатка флуоресцеина в составе субстрата (Рис. 1Б, В) показывают параллельно протекающие изменения конформации ДНК, которые также описываются трехстадийным процессом. При этом эксперименты с радиоактивно-меченным FAM-8-охоG/A показали, что фермент не способен производить удаление аденина из олигонуклеотидного дуплекса с флуоресцеиновой меткой, вероятно в силу влияния объемного заместителя на формирование сети контактов в активном центре фермента.

Таким образом, взаимодействие MutY с 8-охоG/A-субстратом удовлетворительно описывается трехстадийной кинетической схемой (Схема 1, 2).

Схема 1

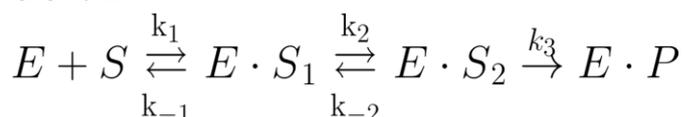
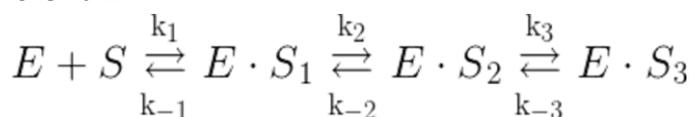


Схема 2



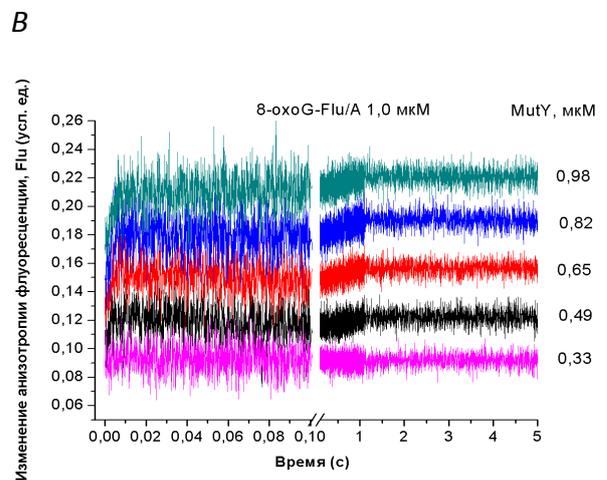
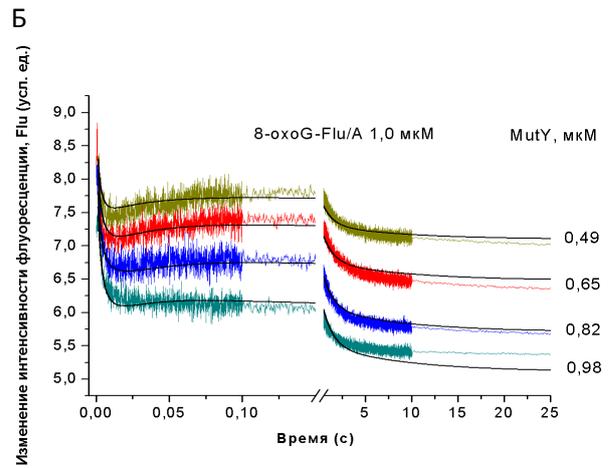
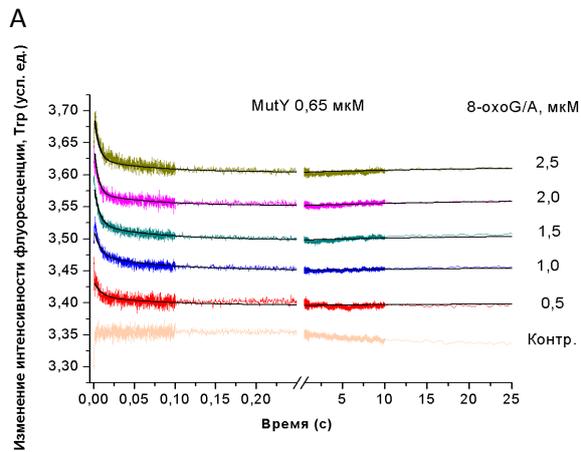
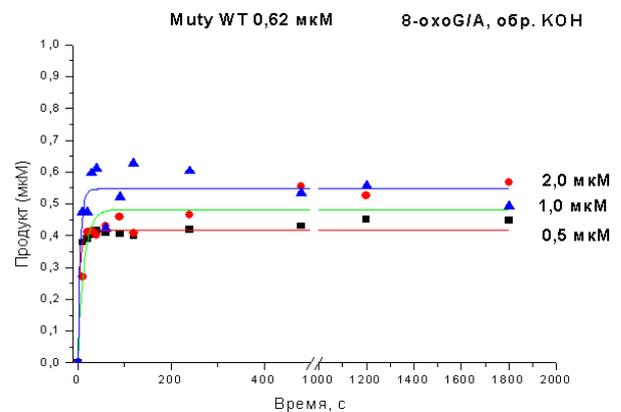


Рис. 1. (А) Экспериментальные и расчетные кинетические кривые флуоресценции Trp, полученные при взаимодействии MutY ($C = 0,65$ мкМ) с 8-охоG/A-субстратом. Кинетические кривые, полученные при взаимодействии MutY с FAM-8-охоG/A-субстратом ($C = 1,0$ мкМ). (Б) Изменение интенсивности флуоресценции остатка флуоресцеина. (В) Изменение анизотропии флуоресценции.

Рис. 2. Накопление продукта реакции MutY и 8-охоG/A-субстрата.



Взаимодействие фермента MutY с G/A-содержащей ДНК

При взаимодействии фермента с данным субстратом снижение интенсивности флуоресценции Tgr на начальном участке кинетических кривых значительно менее выражено по сравнению с G/A-ДНК, но полученное значение константы скорости образования первичного комплекса отличается менее чем в 2 раза, указывая на то, что на данной стадии протекает образование неспецифических контактов между гликозилазой и ДНК.

Вторая фаза уменьшения интенсивности флуоресценции происходит значительно медленнее, чем для oхoG/A-ДНК, указывая на протекание процесса распознавания оснований G и 8-охоG. Основываясь на структурных данных и аналогии с другими гликозилазами суперсемейства HhH-GPG можно предположить, что ключевая роль при узнавании повреждения принадлежит аминокислотным остаткам Tyr88 и Ser308, при этом образование водородных связей между Ser308 и O8 атомом кислорода и пиррольным N7 8-оксогуанина определяет специфичность фермента к паре oхoG/A. Таким образом, отсутствие специфических взаимодействий G с Ser308 приводит к замедлению стадии образования каталитического комплекса, давая значение соответствующей константы скорости реакции более чем на порядок ниже, чем для 8-охоG/A-ДНК. Процесс непосредственно удаления повреждения при этом протекает значительно медленнее, чем для 8-охоG/A-субстрата, что не позволяет однозначно идентифицировать на кинетических кривых рост интенсивности флуоресценции, который должен характеризовать каталитическую стадию реакции. Регистрируемые изменения флуоресценции описываются двухстадийной кинетической схемой (Схема 3).

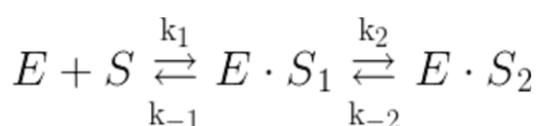


Схема 3

Изменения интенсивности и анизотропии флуоресценции флуоресцеиновой метки, происходящие при взаимодействии фермента с FAM-G/A-ДНК, обладают высокой схожестью с соответствующими кривыми для FAM-8-охоG/A-ДНК, при меньшей выраженности изменений, указывая и на схожесть происходящих конформационных изменений, и также могут быть описаны Сх 2. Вычисленные значения констант скорости и констант равновесия приведены в Таблице 1. Константы равновесия K_2 и K_3 значительно отличаются для FAM-G/A-ДНК и FAM-8-охоG/A-ДНК, что подтверждает предположение о процессе распознавания 8-оксогуанина на этих стадиях.

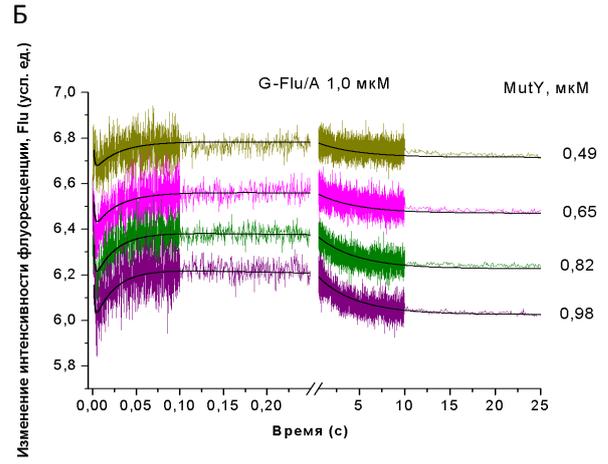
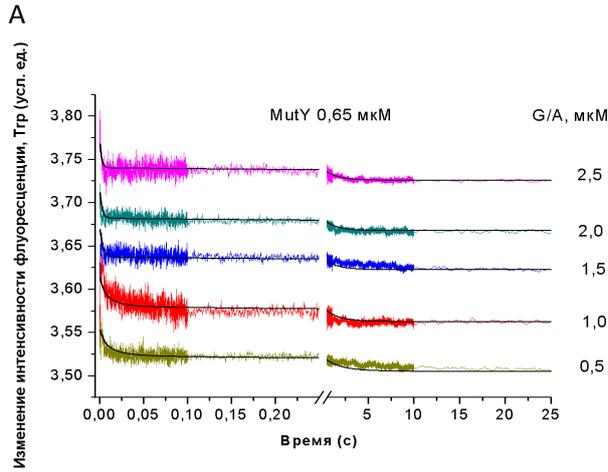


Рис. 3. (А) Экспериментальные и расчетные кинетические кривые флуоресценции Trp, полученные при взаимодействии MutY ($C = 0.65$ мкМ) с G/A-субстратом. Кинетические кривые, полученные при взаимодействии MutY с FAM-G/A-субстратом ($C = 1,0$ мкМ). (Б) Изменение интенсивности флуоресценции FAM. (В) Изменение анизотропии флуоресценции.

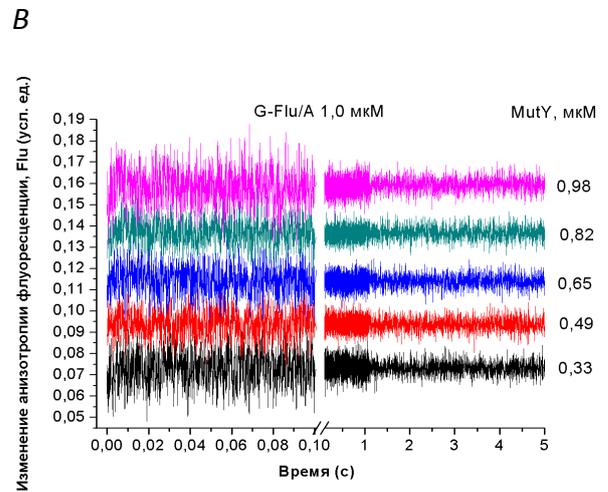
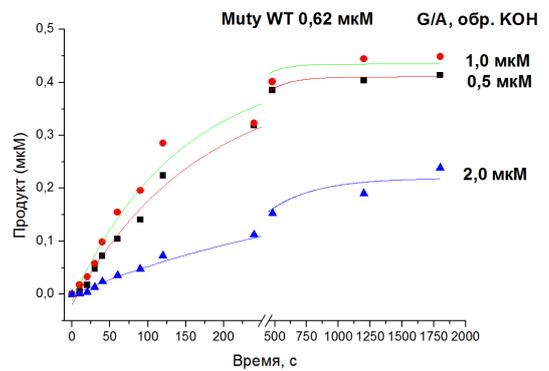


Рис. 4. Накопление продукта реакции MutY и G/A-субстрата.



Взаимодействие фермента MutY с ДНК, содержащей пару *охоG/C*

Фермент MutY высокоспецифичен к основанию А в паре 8-оксогуанин—аденин и не производит удаления других оснований из этого положения. Для анализа конформационных изменений фермента и ДНК при взаимодействии с ДНК, содержащей 8-оксогуанин, но не аденин напротив него, был выбран *охоG/C*-дуплекс, обычно являющийся субстратом для ДНК-гликозилаз Frg и OGG.

Изменение интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии MutY с *охоG/C*-ДНК показывает двухстадийный процесс образования комплекса. Значение константы скорости образования первичного комплекса (Таблица 1) близко к значению таковой для *охоG/A*-ДНК, при в разы более высоком значении константы скорости диссоциации, указывая на образование неспецифических контактов фермент-ДНК, но на меньшее значение стабилизирующих контактов с неспецифичным основанием. Кроме того, константа скорости образования второго комплекса в разы меньше для случая неспецифичного субстрата.

Кинетические кривые для взаимодействия MutY с FAM-*охоG/C*-ДНК (Рис. 5) свидетельствуют о трехстадийном процессе взаимодействия, где первая стадия аналогична первой стадии реакции с FAM-8-*охоG/A*-ДНК. Однако при этом отсутствует дальнейший рост интенсивности флуоресценции, отмеченный для субстратов FAM-8-*охоG/A* и FAM-*G/A*, что позволяет связать данный процесс со специфическим взаимодействием фермента с удаляемым азотистым основанием, которое в данном случае отсутствует.

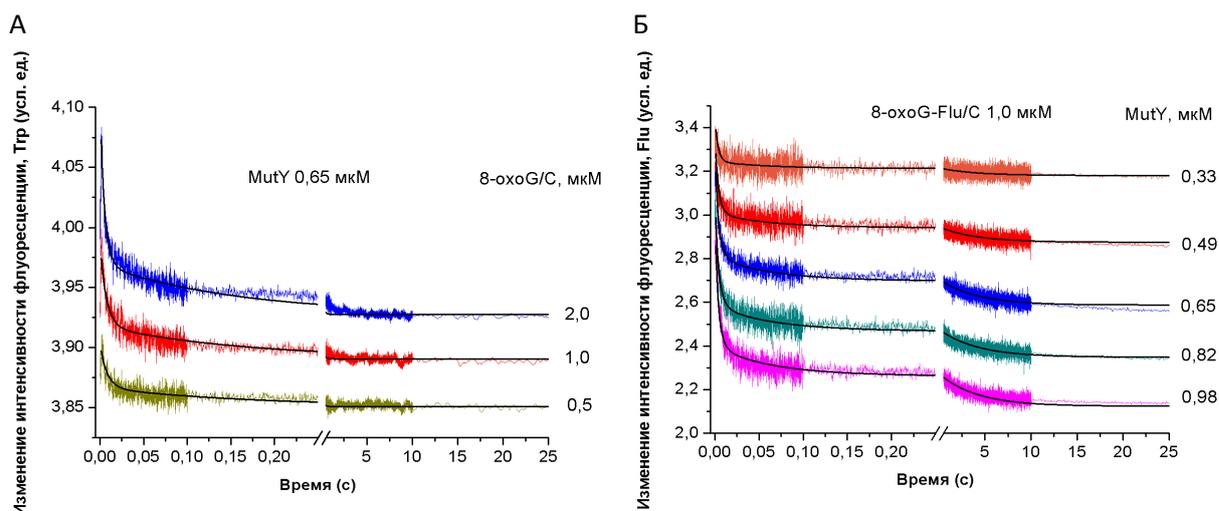


Рис. 5. (А) Экспериментальные и расчетные кинетические кривые флуоресценции Trp, полученные при взаимодействии MutY ($C = 0.65 \mu\text{M}$) с 8-*охоG/C*-субстратом. (Б) Изменение интенсивности флуоресценции при взаимодействии MutY с FAM-*охоG/C*-субстратом ($C = 1,0 \mu\text{M}$).

Взаимодействие фермента MutY с ДНК, содержащей пару F/G

Удаление азотистого основания из ДНК приводит к образованию AP-сайта, при этом диссоциация фермент-продуктного комплекса является лимитирующей стадией всей реакции в целом. Для наблюдения конформационных изменений, происходящих с ДНК-продуктом, использовался олигонуклеотидный дуплекс FAM-F/G, содержащий F-лиганд, нерасщепляемый аналог AP-сайта. Кинетические кривые (Рис. 6) изменения интенсивности и анизотропии флуоресценции FAM, имеющие более ярко выраженный характер в силу нахождения флуоресцентной метки непосредственно на содержащей аналог AP-сайта цепи олигонуклеотида, описываются трехстадийным механизмом. Неспецифичность процесса первой стадии реакции характеризуется близкими значениями соответствующих констант для FAM-F/G- и FAM-G/A-субстратов.

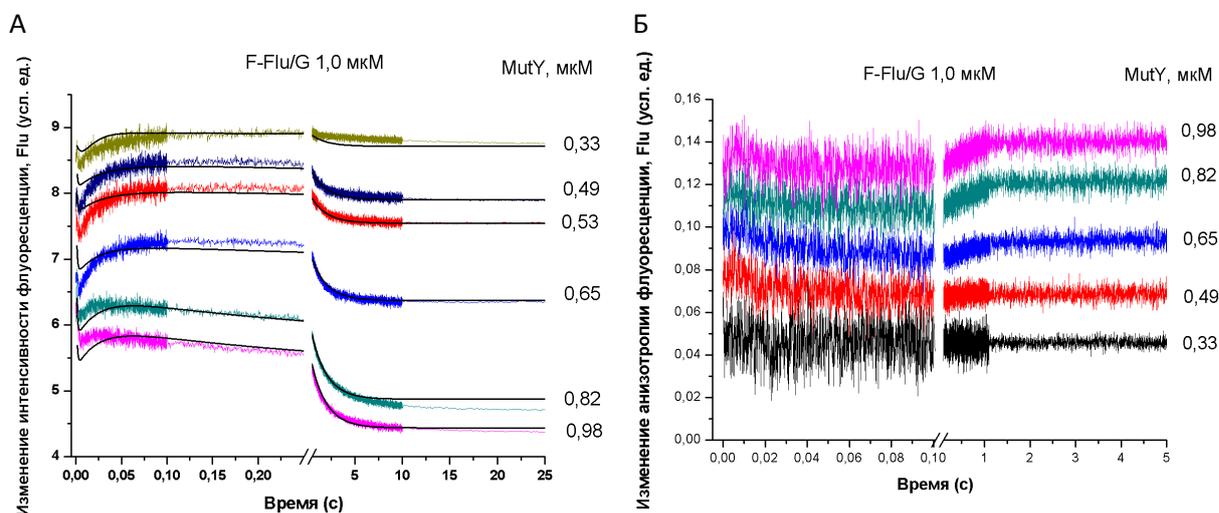


Рис. 6. Кинетические кривые, полученные при взаимодействии MutY с FAM-F/G-субстратом ($C = 1,0$ мкМ). (А) Изменение интенсивности флуоресценции FAM. (Б) Изменение анизотропии флуоресценции.

Константы	8-охоG/A	G/A	8-охоG/C	FAM-охоG/A	FAM-G/A	FAM-охоG/C	FAM-F/G
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	130 ± 30	220 ± 10	90 ± 30	710 ± 110	680 ± 130	270 ± 40	900 ± 300
k_{-1}, c^{-1}	46 ± 13	1,4 ± 0,9	90 ± 20	10 ± 4	180 ± 50	35 ± 6	230 ± 60
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	2,8	160	1,0	71	3.8	7.7	3.9
k_2, c^{-1}	16 ± 8	0,9 ± 0,23	3,5 ± 1,1	26 ± 6	48 ± 9	9.2 ± 2.8	40 ± 10
k_{-2}, c^{-1}	7,3 ± 1,3	0,3 ± 0,2	9,0 ± 1,4	2.5 ± 1.4	0.03 ± 0.02	9.9 ± 2.6	0.004 ± 0.003
K_2	2,2	3	0,4	10.4	1.6×10^3	0.93	1.0×10^4
k_3, c^{-1}	0,051 ± 0,004			0.7 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.19 ± 0.07	0.8 ± 0.6
k_{-3}, c^{-1}				0.13 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.13 ± 0.05	0.3 ± 0.2
K_3				5.4	1.5×10	1.5	2.7

Таблица 1: Значения констант скорости и равновесия кинетических стадий взаимодействия MutY с различными ДНК-субстратами

Таким образом, процесс узнавания сайта 8-охоG/A и удаления повреждения ДНК-гликозилазой MutY происходит последовательно. На первой стадии происходит образование неспецифических контактов между ДНК-связывающим центром фермента и ДНК. На второй стадии происходит дискриминация 8-оксогуанина и гуанина и происходит узнавание основания, расположенного напротив 8-охоG. На третьей стадии производится расщепление N-гликозидной связи и удаление аденина.

Молекулярная динамика фермента hOGG1 дикого типа и мутантных форм K249Q, D268A, G42S, R154A, Y203A, R204A в комплексе с 8-охоG-ДНК и G-ДНК

Для фермента hOGG1 имеется относительно большой объем экспериментальных кинетических и структурных данных, описывающих как белок дикого типа, так и его различные мутантные формы. С целью их дополнения было произведено молекулярное моделирование структур комплексов hOGG1 дикого типа и мутантов K249Q, D268A, G42S, R154A, Y203A и R204A с ДНК, содержащей 8-охоG/C либо G/C пару, а также соответствующих структур фермента и ДНК в свободной форме.

Нахождение неповрежденного основания в активном центре фермента, и для белка дикого типа, и для мутантных форм, приводит к искажению структуры активного сайта фермента и вытеснении вывернутого азотистого основания, что согласуется с известными из литературы результатами молекулярно-динамических расчетов для кристаллической структуры комплекса, содержащей гуанин в активном центре фермента. Значительные изменения претерпевает положение боковой цепи аминокислотного остатка Lys249, смещаясь из своего исходного положения и преимущественно формируя водородную связь с O3' атомом вывернутого гуанозина. Таким образом, расстояние N ζ (Lys249)–N9'(8-охоG) возрастает, расстояние N ζ (Lys249)–C1'(8-охоG) сохраняет приблизительно то же значение и угол N ζ (Lys249)–C1'–N9(G) меняется с 64° до 112° в сравнении с 8-охоG-ДНК комплексом. При этом относительное положение аминокислотного остатка Asp268 не претерпевает значимых изменений, сохраняя контакты с N2 и O4' атомами нуклеозида. Помещенный в активный центр фермента гуанин также не образует полноценного контакта с аминокислотным остатком Phe319, который формирует одну из стенок активного центра, что отражается в полуторакратном увеличении расстояния между ароматическими циклами аминокислотного остатка и азотистого основания.

Структура комплекса, образованного мутантной формой K249Q с 8-охоG-ДНК, сохраняется близкой как и исходной кристаллической структуре, так и к моделируемой структуре белка дикого типа, в то время как конформация активного центра мутантной формы D268A претерпевает значительные изменения, демонстрируя стабильное отсутствие водородной связи между N7 атомом нуклеотида и карбонильным атомом кислорода аминокислотного остатка G42, которая считается ключевым элементом дискриминации между поврежденным и неповрежденным основаниями. Структуры комплексов мутантных форм K249Q и D268A с G-ДНК отличаются меньшей выраженностью изменений конформации, присущих аналогичному комплексу фермента дикого типа. Такая картина в целом указывает не только на критическую роль этих аминокислотных остатков для процесса катализа непосредственно, но и на их значение для распознавания повреждения.

Согласно рентгеноструктурным данным, аминокислотный остаток Gly42 является ключевым для определения 8-оксогуанина и его позиционирования в активном центре фермента, образуя устойчивую водородную связь между карбонильным атомом кислорода и пиррольным N7 атомом 8-оксогуанина, тогда как гуанин обладает пиридиновым азотом

в соответствующем положении. Соответственно, замена глицина на аминокислотный остаток, который способен выступить донором для образования водородной связи, может привести к получению мутантной формы, имеющей сродство к неповрежденной ДНК. Замена G42S является подходящим возможным вариантом, предоставляя гидроксильную группу для взаимодействия с N7 атомом гуанина. Моделирование с использованием различных ротамеров серина показало, что в белке свободной формы устойчивой является только одна конформация, тогда как в моделях комплекса фермент-ДНК образуются две возможные конфигурации активного сайта, в одной из которых боковая цепь Ser42 формирует водородную связь с карбонильным атомом кислорода аминокислотного остатка Pro40, внося значительные искажения в активный сайт фермента. Вторая возможная конфигурация демонстрирует возможность формирования устойчивых водородных связей и между пиридиновым азотом гуанина и гидроксильной группой боковой цепи серина, и между пиррольным азотом 8-оксогуанина и карбонильным атомом кислорода аминокислотного остатка. В обоих случаях структура активного центра фермента остается близкой к структуре комплекса фермента дикого типа и 8-охоG-ДНК.

Согласно литературным данным, аминокислотные остатки Arg154, Arg204 и Tyr203 встраиваются в ДНК после выворачивания основания и взаимодействуют с цитозином, расположенным напротив 8-охоG; их замена приводит к значительному снижению каталитической активности фермента. Моделирование мутантной формы R154A, несмотря на относительную удаленность данной замены от активного центра фермента, демонстрирует внесение значительных искажений в его конфигурацию, с отсутствием водородной связи между Ser42 и N7 8-охоG и удалением боковой группы Lys249 от вывернутого основания. Замены Y203A и R204A не вносят значительных искажений в структуру активного центра фермента, оказывая непосредственное влияние только на окружение азотистого основания С.

Для относительной оценки влияния замен на стабильность комплекса фермент-ДНК была вычислена полная энергия связи комплекса, определяемая как разница между полной энергией комплекса и полной энергией свободного фермента и свободной ДНК (Таблица 2). Несмотря на невозможность прямого сравнения с экспериментальными данными, эта величина отражает относительные изменения, вызванные теми или иными заменами. Так, нахождение G вместо 8-охоG в активном центре фермента во всех случаях значительно менее энергетически выгодно; при этом замена D268A, устраняющая боковую группу аминокислотного остатка, непосредственно взаимодействующего с вывернутым основанием, уменьшает относительную напряженность комплекса. Также выделяется замена Y203A, уменьшающая взаимодействие фермента с ДНК напротив повреждения.

	WT	R249Q	D268A	G42S	R154A	R204A	Y203A
G-ДНК	-21,9	-15,9	-62,4	-19,4	-12,4	-12,2	-9,9
8-охоG-ДНК	-92,3	-59,7	-42,2	-7,8	-23,4	-51,9	-16,4

Таблица 2: Полная энергия связи комплекса фермент-ДНК для различных мутантных форм, ккал/моль.

Выводы

- Процесс удаления ошибочно спаренного основания из ДНК ферментом MutY характеризуется последовательным образованием неспецифических контактов между ДНК и ферментом, распознаванием 8-оксогуанина или немодифицированного гуанина, распознаванием находящегося напротив основания и протеканием гидролиза N-гликозидной связи.
- Мутантная форма MutY S120K обладает свойствами бифункциональной гликозилазы, проявляя как гликозилазную, так и АП-лиазную активность. При этом собственно гликозилазная активность значительно снижена по сравнению с ферментом дикого типа, что обусловлено изменением набора специфических взаимодействий между удаляемым основанием и активным центром фермента. Мутантная форма MutY A124K полностью утрачивает каталитическую активность.
- Снижение активности мутантных форм Y203A, R204A hOGG1 обусловлено нарушением формирования водородных связей между цепью ДНК, расположенной напротив поврежденного основания, и контактными центрами фермента, тогда как замена R154A также приводит к изменению строения активного центра фермента. Для мутантной формы G42S результаты молекулярного моделирования позволяют предположить возможность взаимодействия и с неповрежденным гуанином.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Из списка ВАК:

Тюгашев Т.Е., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. Особенности взаимодействия аденин-ДНК-гликозилазы MutY из *E. coli* с ДНК-субстратами. Биоорганическая химия. 2017. Т. 43. № 1. С. 18–28.

Тезисы:

VII Российский симпозиум «Белки и Пептиды» (2015), «Химическая биология-2016», IX Международная конференция им. В.В. Воеводского "Физика и химия элементарных химических процессов" (2017)

Отчет о проверке текста
научно-квалификационной работы
на объем заимствования

Тюгашев Тимофей Евгеньевич

«Репарация окислительных повреждений ДНК 8-оксогуанин-ДНК-
гликозилазой hOGG1 и аденин-ДНК-гликозилазой MutY»

Оценка оригинальности: 94.27%

Заимствования: 5.73%

№ документа: 995680

Имя исходного файла: Научный_доклад_Тюгашев.docx

Размер файла: 498.3 КБ

Размер текста: 18896

Слов в тексте: 2617

Число предложений: 180

Источники (доля в тексте – ссылка):

10.2% <https://www.rusprofile.ru/id/1451999>

10.2% <http://www.list-org.com/company/814678>

10.0% <http://docplayer.ru/57412726-Molekulyarno-dinamicheskij-analiz-substratnoy-specifichn...>

17.1% <http://www.dissercat.com/content/strukturnye-i-dinamicheskie-aspekty-funktsionirovani...>

10.8% <http://geum.ru/aref/kineticheskij-mehanizm-deystviya-apurinovoy-apirimidinovoy-endonu...>

19.65% <http://earthpapers.net/konformatsionnye-prevrashcheniya-ferment-substratnyh-kompleksov...>

17.1% <http://kursak.net/strukturnye-i-dinamicheskie-aspekty-funkcionirovaniya-dnk-n-glikozi...>

10.8% <http://earthpapers.net/kineticheskij-mehanizm-deystviya-apurinovoy-apirimidinovoy-end...>

7.55% <https://docplayer.ru/76962318-Kuznecov-nikita-aleksandrovich-molekulyarno-kinetichesk...>

6.9% <http://chem21.info/info/573632/>

Оригинальность работы составляет ___94.27___ % , что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» на сайте www.antiplagius.ru
06.09.2018 г.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. К.В. Разум