



ООО «СибЭнзим»

630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12
E-mail: info@sibenzyme.ru
<http://www.sibenzyme.ru>

Тел.: (383) 333-49-91
Тел./Факс: (383) 333-68-53

ОТЗЫВ

официального оппонента Гончара Д.А. на диссертационную работу Ендуткина Антона Валентиновича «Роль структуры ДНК-субстратов и структурных элементов белка в процессах узнавания и удаления повреждений 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилазами человека и *E. coli*», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия»

Диссертационная работа Ендуткина А.В. посвящена изучению влияния структуры ДНК-субстратов, ДНК-белковых и внутримолекулярных взаимодействий в белке на эффективность узнавания и расщепления поврежденной ДНК 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилазами OGG1 и Fpg. Данные ДНК-гликозилазы являются частью эксцизионной репарации оснований (ЭРО) у эукариот и прокариот, соответственно. Актуальность диссертационной работы связана с важностью изучения систем репарации ДНК, как неотъемлемой части жизнеобеспечения отдельной клетки, и всего организма в целом. Окислительные повреждения оснований, часто встречающиеся в ДНК, играют значительную роль в онкогенезе, старении и многих патологиях. Именно система ЭРО препятствует накоплению этих повреждений, и является, таким образом, важнейшим фактором, обеспечивающим целостность генома клетки.

8-оксогуанин (8-охоGua) является одним из самых распространенных окисленных оснований ДНК, а репарация этого повреждения идет по пути ЭРО с участием ДНК-гликозилаз OGG1 или Fpg. Известно, что субстратная специфичность ДНК-гликозилаз зависит не только от структуры и конформационной динамики молекулы фермента, но и от нуклеотидной последовательности и структурных особенностей субстратной ДНК. При этом, несмотря на имеющиеся данные о пространственных структурах ферментов репарации в свободном виде и в комплексе с ДНК-субстратами, анализ таких статичных структур не позволяет судить о динамике ферментов в ходе реакции. С другой стороны, хотя множество кинетических исследований в целом дало ответ на вопрос о количестве стадий реакции и их временных рамках, остаются открытыми вопросы, какие именно структурные изменения происходит на каждой кинетически различимой стадии. В этой

связи диссертационная работа Ендуткина А.В., посвящённая комплексному анализу термодинамических и кинетических параметров ферментативной реакции с участием OGG1 или Fpg, дополненному структурными данными и данными, полученными с использованием сайт-направленного мутагенеза, решает важные исследовательские задачи, и, несомненно, является актуальной и своевременной.

Диссертационная работа написана в традиционной форме. Она изложена на 140 страницах, содержит 55 рисунков, 16 таблиц и список литературы, включающий 371 ссылку. Диссертация состоит из семи разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список цитированной литературы».

Во **«Введении»** автор кратко излагает состояние вопроса в области изучения субстратной специфичности 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаз OGG1 и Fpg, обосновывает теоретическую и практическую значимость работы по выбранной теме, формулирует цель работы и те задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели.

Глава **«Обзор литературы»**, состоящая из шести основных разделов, посвящена всестороннему описанию накопленных к настоящему времени данных о конформационных параметрах ДНК, о свойствах 8-оксоGua и его биологическом действии, а также об основных путях эксцизионной репарации оснований. Автором собрана и проанализирована информация об известных на сегодня ДНК-гликозилазах, их классификации и механизмах действия в рамках ЭРО. В этой же главе автор описывает основные характеристики ДНК-гликозилаз Fpg, OGG1 и их гомологов. При этом в тексте отмечается, что механизм расходования и перераспределения энергии в системе фермент-ДНК, которую приобретает ДНК-гликозилаза при связывании с субстратом, детально не изучен и остаётся предметом споров.

Хочется отметить, что текст обзора написан достаточно хорошим литературным языком, отличается высоким качеством изложения материала, проиллюстрирован двадцатью рисунками и двумя таблицами. Обращает на себя внимание не только широкая эрудиция диссертанта в рассматриваемых им вопросах, но и способность Ендуткина А.В. всесторонне и критически анализировать имеющиеся литературные источники.

В главе **«Материалы и методы»** приводится детальное описание основных молекулярно-биологических и биохимических методик, использованных диссертантом в работе.

Результаты и их обсуждение приведены в 4-ой главе диссертации. Здесь можно выделить шесть логически связанных между собой блока исследований:

- изучение влияния структуры ДНК на кинетические параметры реакции, катализируемой ДНК-гликозилазами;
- анализ термодинамических параметров суммарного стэкинг-взаимодействия 8-охоGua;
- анализ свойств С- и N-концевых доменов фермента Fpg;
- определение функционально важных внутримолекулярных взаимодействий в белке Fpg;
- выявление роли выворачивания нуклеотида с 8-охоGua в узнавании повреждения ферментами Fpg и OGG1;
- изучение влияния целостности сахарофосфатного остова ДНК на активность фермента Fpg.

В результате выполнения первого блока исследований диссертантом показано, что изгиб ДНК, вызванный присутствием неканонических пар оснований и конформационными особенностями её последовательности, оказывает влияние на кинетические параметры реакции, катализируемой ДНК-гликозилазами. Согласно полученным данным, значения K_M для реакций расщепления полностью комплементарных дуплексов ферментом OGG1 были в большинстве случаев в несколько раз меньше, чем для реакций с участием не полностью комплементарных дуплексов, в то время как значения k_{cat} варьировали гораздо меньше. Последнее свидетельствует о том, что гибкость и конформация олигонуклеотидных дуплексов в свободном состоянии слабо влияют на эффективность реакции после образования фермент-субстратного комплекса. С другой стороны, высокие значения K_M говорят о затрудненном образовании фермент-субстратного комплекса, которое может быть вызвано особенностями структуры дуплексов, содержащих неканонические пары. При этом, влияние природы ДНК-субстрата на каталитическую эффективность ДНК-гликозилаз во многом совпадает для Fpg и OGG1.

При выполнении второго блока исследований с помощью метода термической денатурации в растворе был определён полный набор термодинамических параметров суммарного (с 5'- и 3'-стороны) стэкинг-взаимодействия 8-охоGua во всех 16 возможных нуклеотидных окружениях. Проведённый анализ термодинамических параметров выявил существенные различия между Gua и 8-охоGua. Причем природа этих различий может крыться как в электростатических взаимодействиях с растворителем, так и в геометрии оснований.

Третья часть главы посвящена исследованию свойств отдельных доменов ДНК-гликозилазы Fpg из *E. coli*. Были получены варианты N-Fpg и C-Fpg, соответствующие N- и С-концевым доменам Fpg путём экспрессии в *E. coli* кодирующих их участков гена *fpg*. Эксперименты показали, что отдельный N-концевой домен не проявлял ни

каталитической, ни ДНК-связывающей активности. Белок C-Fpg оказался неспособен расщеплять ДНК-субстраты, содержащие повреждённые основания, в том числе 8-охоGua, однако в ходе выделения C-Fpg была выявлена активность по отношению к субстрату с альдегидным AP-сайтом. При этом значение k_{cat} для C-Fpg было на несколько порядков ниже по сравнению с полноразмерным ферментом. Исходя из этого, было сделано заключение, что C-концевой домен Fpg обладает низким сродством к ДНК-субстрату и малым числом оборотов, то есть C-Fpg способен с некоторой эффективностью катализировать расщепление AP-ДНК, которое, как и в случае полноразмерного Fpg, протекает по механизму β -элиминирования.

В ходе выполнения четвёртого блока были исследованы биохимические свойства восьми вариантов мутантных форм фермента Fpg в сравнении с ферментом дикого типа. В результате было показано, что внутри молекулы Fpg присутствуют удаленные от активного центра кластеры аминокислот, оказывающих серьёзное влияние на способность фермента связывать и расщеплять ДНК-субстрат. Например, любые мутации в паре R54–E131 делали фермент неактивным, а мутации в мостике Gln234–Arg244, напротив, слабо влияли на его активность. Замена S208A практически не имела эффекта, в то время как Y170F снижала активность в 1750 раз. Кроме того, мутации одинаково влияли на способность Fpg использовать как AP-, так и 8-охоGua-субстраты. Также было установлено, что мутации, затрагивающие мостик R54–E131, делали фермент неспособным связывать ДНК. Остальные мутанты проявляли сродство от одинакового с белком дикого типа до сниженного в 35 раз.

На пятом этапе работы проводилось изучение роли выворачивания повреждённого нуклеотида в узнавании 8-охоGua ДНК-гликозилазами OGG1 и Fpg. В результате выполнения работы в сотрудничестве с американскими коллегами были энергетически и структурно охарактеризованы процессы выворачивания нуклеотидов, содержащих 8-охоGua и Gua, для OGG1 человека и Fpg *Geobacillus stearothermophilus* с использованием направленной молекулярной динамики. Анализ профилей свободной энергии, рассчитанных для выворачивания нуклеотидов с 8-охоGua и Gua обоими ферментами, выявил значительную разницу в энергии конечных состояний. Так, более энергетически выгодным для Gua оказалось внутриспиральное расположение, в то время как для 8-охоGua – внеспиральное вывернутое расположение. Было показано, что профили свободной энергии для обоих ферментов содержат главным образом четыре явных области, соответствующих, по-видимому, стадиям энергетической и структурной верификации повреждения.

Шестая часть главы посвящена исследованию влияния целостности сахарофосфатного остова ДНК на активность фермента Frg. В ходе работы были сконструированы субстраты, в которых отсутствовала одна из шести ближайших фосфоэфирных связей поврежденной цепи с каждой из сторон от 8-охоGua. Полученные результаты подтвердили значимость механической связи в ДНК-субстрате, которая является критичной для конформационных преобразований, инициированных ферментом.

Итоговая часть диссертации, раздел «**Заключение**», очень органично завершает работу. В нём ещё раз подчёркиваются основные моменты диссертации и их научное значение для понимания процесса удаления повреждённых оснований ДНК-гликозилазами из разных организмов.

Необходимо отметить, что полученные диссертантом новые данные о свойствах ДНК-гликозилаз Frg, OGG1 и механизмах узнавания и удаления ими повреждений в ДНК, вносят существенный вклад в современные представления о системе ЭРО. Так, проведённое исследование развивает и углубляет модель механизма действия ДНК-гликозилаз, в соответствии с которой после первичного связывания фермента с ДНК комплекс претерпевает несколько конформационных изменений, а в промежуточных кинетически стабильных конформерах возникают специфичные для повреждения контакты, которые не могут быть образованы с нормальными основаниями. В данной работе впервые было показано, что несколько селективных конформеров возникают на стадии выворачивания повреждённого основания, которая ранее рассматривалась как один этап процесса узнавания. Полученные диссертантом данные свидетельствуют о важности механического напряжения, передающегося по ковалентному контуру ДНК, для её конформационных преобразований, инициированных ферментом. Также впервые проведён биохимический анализ эволюционно значимых взаимодействий в молекуле фермента Frg. Научная ценность и актуальность работы подтверждается пятью публикациями в научных изданиях, в том числе четырьмя – в зарубежных журналах.

Диссертационная работа в целом представляет собой законченное научное исследование. Выводы, сформулированные в диссертации, адекватны полученным результатам. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Можно без преувеличения сказать, что Ендуткиным А.В. проделана объёмная и достаточно сложная в методическом исполнении работа. Исследования выполнены с применением современных методов биохимии, молекулярной биологии и компьютерного моделирования. Достоверность представленных в диссертации результатов и обоснованность выводов не вызывают сомнений. Материалы исследования апробированы на тринадцати международных конференциях. По теме диссертации опубликовано пять

статей, из них четыре в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, и одна в российском рецензируемом журнале.

Серьёзных замечаний к представленной работе нет. Но, в то же время, есть несколько недочётов:

1. В «Оглавлении» отсутствует раздел «Список цитированной литературы».

2. В «Списке сокращений» словосочетание «апуриновый-апиримидиновый» обозначено по-русски (АП), тогда как в тексте диссертации везде используется английская аббревиатура (AP).

3. В разделе 4.3 «Анализ свойств отдельных доменов белка Frg» главы «Результаты и их обсуждение» просматривается определённое несоответствие трактовок результатов, представленных на рисунках 32 и 33. Так, на второй дорожке рисунка 32, где нанесена аликвота из фракции 2, не видно полосы, соответствующей полноразмерному ферменту Frg, и в то же время на рис.33 видно, что продукт расщепления AP-субстрата после добавления аликвоты из той же фракции 2 практически не отличается по интенсивности свечения от дорожки 1, где представлен продукт расщепления исходным ферментом Frg. Автором даётся объяснение, что «вероятно, во фракции 2 присутствует примесь полноразмерного белка Frg из бактериальных клеток, использованных для выделения C-Frg». Но тогда получается, что или примесный исходный фермент Frg обладает очень высокой удельной активностью, находясь в крайне малой концентрации, либо время инкубации C-Frg с AP-субстратом оказалось достаточным, чтобы образовалось достаточно большое количество продукта реакции несмотря на то, что C-Frg, как утверждается на стр. 82, «характеризуется низким сродством к ДНК-субстрату и малым числом оборотов». Этот момент было бы неплохо прояснить.


4. Раздел 4.4 главы «Результаты и их обсуждение» описывает очень важные для работы эксперименты с использованием мутантных форм белка Frg. Но при этом в тексте нет внятного объяснения, как и кем были получены эти мутантные формы. По моему мнению, эта часть экспериментальной работы является достаточно значимой, чтобы быть описанной хотя бы в разделе «Материалы и методы», либо необходима ссылка на использованный метод. Всё, что удалось найти в тексте по этому поводу – это одно предложение на стр. 87: «...для белка Frg *E.coli* с помощью сайт-направленного мутагенеза каждая аминокислота подвергалась замене...», а в главе «Материалы и методы» имеется только раздел «Выделение мутантных форм Frg», описывающий выделение белков из готовых конструкций.

Тем не менее, выявленные замечания носят рекомендательный характер и касаются, скорее, оформления диссертационной работы, а не её сути. Отмеченные

недостатки не влияют на общее очень хорошее впечатление от работы и не снижают её значимости как самостоятельного исследования.

Всё вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа Ендуткина Антона Валентиновича, представленная на соискание учёной степени кандидата химических наук, как по содержанию, так и по оформлению соответствует установленным требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (редакция №335 от 21.04.2016 г.), а сам Ендуткин А.В. достоин присуждения ему искомой степени по специальности 03.01.04 – биохимия.

Гончар Данила Александрович,
кандидат биологических наук,
зам. директора по производству
ООО «СибЭнзайм».
Тел.: (383)-412-96-07
E.mail: gonchar@sibenzyme.ru



Гончар Д.А.

Подпись к.б.н. Д.А. Гончара
ЗАВЕРЯЮ
Яковлев Владимир Георгиевич,
директор ООО «СибЭнзайм»,



Яковлев В.Г.

30 ноября 2018 г.