



**МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
(МГУ)**

Ленинские горы, Москва,
ГСП-1, 119991
Телефон: 939-10-00
Факс: 939-01-26

21.05.2019 № 488-19/013-03
На № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
начальник Управления научной политики и организации научных исследований,
доктор физико-математических наук,
профессор А.А. Федянин



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования

«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

о диссертационной работе Кладовой Ольги Алексеевны на тему:

«Конформационная динамика ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII в процессе взаимодействия с ДНК», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы выполненной работы. Диссертационная работа Кладовой Ольги Алексеевны посвящена актуальной проблеме исследования особенностей конформационной динамики фермент-субстратных комплексов в процессе образования каталитически-компетентного состояния на примере ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII, участвующих в системе эксцизионной репарации оснований ДНК, отвечающей за удаление гетероциклических оснований, содержащих необъемные окислительные повреждения. Обе указанные ДНК-гликозилазы осуществляют гидролиз N-гликозидной связи в цепи ДНК и обладают субстратной специфичностью преимущественно к модифицированным пиримидиновым основаниям, хотя и принадлежат к разным структурным семействам. Известно, что нарушение механизмов репарации ДНК в целом приводит к различным

патологическим процессам, в число которых входят канцерогенез, дефекты развития и старение. До сих пор непонятно, каким образом ДНК-гликозилазы осуществляют дискриминацию субстратных и несубстратных азотистых оснований. Ясно, что связывание субстратного основания в активном центре фермента должно предваряться его селекцией среди других оснований, которые в принципе могут, но не должны служить субстратами. Изучение механизмов такой селекции субстратов на сегодняшний день чрезвычайно актуально не только для углубления знаний собственно о репарации ДНК, но и для понимания механизма действия ферментов вообще и создания белковых катализаторов с заданными свойствами.

Новизна полученных результатов, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации. В работе Кладовой О.А. впервые проведено кинетическое и термодинамическое исследование взаимодействия двух ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII и их мутантных форм с ДНК-субстратами различной степени специфичности. В результате получены термодинамические параметры быстропротекающих стадий взаимодействия этих ДНК-гликозилаз с ДНК. Сопоставление полученных данных о конформационной динамике молекул ферментов и ДНК-субстратов с известными рентгеноструктурными данными позволило предложить молекулярно-кинетическую модель взаимодействия Endo III и Endo VIII с ДНК. Принципиально важным является выяснение роли отдельных каталитических аминокислотных остатков в активном центре обеих ДНК-гликозилаз в проявлении ими как N-гликозилазной, так и AP-лиазной активности.

Значимость полученных результатов для развития соответствующей отрасли науки. Ежедневно в молекулах ДНК каждой клетки человеческого тела около 100000 звеньев повреждаются за счет разнообразных эндогенных процессов и экзогенных генотоксичных воздействий. Повреждения ДНК могут приводить к появлению мутаций, провоцировать гибель клетки или служить толчком к ее злокачественному перерождению. В этой связи исследование механизмов работы систем репарации различных повреждений ДНК имеет огромное как

теоретическое, так и практическое значение. Система эксцизионной репарации оснований исправляет наиболее распространенные типы повреждений ДНК: одноцепочечные разрывы, апурин-апиримидиновые сайты и поврежденные основания. Процесс удаления поврежденных оснований ДНК инициируется ДНК-гликозилазами. Исходя из их аминокислотных последовательностей и пространственных структур, ДНК-гликозилазы можно разделить на несколько семейств, совершенно не родственных друг другу. При этом, некоторые ДНК-гликозилазы, относящиеся к разным семействам, могут использовать в качестве субстрата ДНК, содержащую одно и то же повреждение, являя собой пример конвергентной эволюции белков, при которой разные по происхождению ферменты выполняют одну и ту же функцию в клетке. Изучение таких белков чрезвычайно интересно, а исследованные в работе Кладовой О.А. ДНК-гликозилазы Endo III и Endo VIII как раз и представляют собой ферменты разных классов, узнающие один тип повреждений ДНК.

Основная часть представленных в диссертации результатов опубликована в российских и зарубежных научных журналах, результаты доложены на международных конференциях. Содержание автореферата соответствует диссертационной работе и опубликованным материалам. Актуальность работы и приоритетность полученных данных не вызывают сомнений.

Объем и структура диссертации. Диссертация Кладовой О.А. построена по стандартному принципу и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Несколько необычно и неудобно то, что список сокращений, использованных в работе, помещен не в начало, а в конец диссертации - между выводами и списком литературы. Содержание диссертации полностью соответствует специальности.

Во введении дана общая характеристика работы, четко обозначены объекты, цель и задачи исследования, обоснована актуальность изучения ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII. Также во введении сформулирована научная новизна, теоретическая и практическая значимость, указан личный вклад автор

и представлены основные результаты диссертационной работы, выносимые на защиту.

Глава 1 «**Обзор литературы**» включает четыре раздела. В первом из них рассматриваются основные типы повреждений ДНК, во втором – типы систем репарации. Третий раздел посвящен конкретному описанию системы эксцизионной репарации оснований. Эти разделы небольшие, но крайне необходимые для читателей работы, поскольку они позволяют сразу понять место и важность исследования ДНК-гликозилаз. Основной раздел обзора литературы посвящен анализу структурных суперсемейств ДНК-гликозилаз: урацил-ДНК-гликолазам, суперсемейству Nhh, к которому относится Endo III, и суперсемейству Fpg/Nei, к которому принадлежит Endo VIII. Обе ДНК-гликозилазы распознают и удаляют продукты окислительного повреждения пиримидинов, основная масса субстратов у них одинаковая, однако существуют субстраты, которые могут удаляться только одним из ферментов. В заключении к обзору литературы обосновывается необходимость детального изучения особенностей взаимодействия ДНК-гликозилаз из разных семейств с ДНК. Действительно, остается до конца неясным, как именно ДНК-гликозилазы узнают поврежденные азотистые основания ДНК в присутствии огромного числа неповрежденных, и за счет каких механизмов существует перекрывание субстратной специфичности у ферментов, принадлежащих к разным структурным суперсемействам и не имеющих ничего общего в структуре.

Обзор литературы носит аналитический и целенаправленный характер. Обзор непосредственно связан с темой диссертации, отражает современное состояние проблемы и помогает лучше понять значимость полученных автором диссертации результатов.

В главе 2 «**Материалы и методы**» описаны экспериментальные подходы, использованные в работе для получения рекомбинантных белков и исследования их взаимодействия с модельными ДНК-дуплексами, содержащими флуоресцентные метки. Основным методом анализа конформационной динамики фермент-субстратных комплексов в процессе образования каталитически-компетентного состояния явился метод «остановленного потока», который позволяет смешивать фермент и субстрат в течение 1 мс. Кинетические

кривые изменения интенсивности флуоресценции фермента или субстрата, отражающие конформационные превращения в ходе фермент-субстратного взаимодействия, анализировали помощью программы Dynafit, которая осуществляет численное интегрирование системы дифференциальных уравнений, соответствующих кинетической схеме, с одновременной оптимизацией констант скорости и коэффициентов удельной флуоресценции всех флуоресцирующих форм. Для получения термодинамических параметров отдельных стадий процесса использовали данные, полученные путем регистрации изменений интенсивности флуоресценции в зависимости от времени при различных температурах. Совершенно очевидно, что Кладова О.А. является квалифицированным специалистом, хорошо владеющим широким спектром современных биологических, физико-химических и компьютерных методов.

Результаты исследования и их обсуждение представлены в главе 3, которая состоит из девяти разделов. В первую очередь диссертантом была изучена конформационная динамика ДНК-субстратов при взаимодействии с Endo III. Для регистрации возникающих конформационных изменений в структуре ДНК в работе использовали ДНК-дуплексы, содержащие субстраты различной степени специфичности и разные флуорофорные группы, расположенные либо в комплементарной цепи напротив повреждений, либо с 3'-стороны от повреждения. В качестве специфических субстратов использовали ДНК-дуплексы, содержащие модифицированный нуклеотид 5,6-дигидроуридин (DHU) или AP-сайт (AP). Остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокситетрагидрофурана в последовательности использовали в качестве нерасщепляемого аналога AP-сайта (F). В качестве неспецифического субстрата использовали неповрежденные дуплексы. Проведенное Кладовой О.А. исследование позволило установить, что взаимодействие Endo III со всеми ДНК-дуплексами проходит через несколько стадий. На основании значений констант скорости отдельных стадий, соответствующих определенному механизму, были рассчитаны константы равновесия этих стадий при разных температурах и определены термодинамические параметры ΔH^0 и ΔS^0 . При сравнительном анализе термодинамических данных было установлено, что общие термодинамические изменения между процессами связывания Endo III со специфическим и

неспецифическим дуплексом имеют четкие качественные отличия. Суммарное связывание с G- и F-лигандами характеризуется положительным изменением энтропии и энтальпии, но в случае связывания с DHU-субстратом – это полностью энтальпийно-контролируемый процесс. Для выяснения влияния каталитических аминокислотных остатков Lys120 и Asp 138 на этапы начального взаимодействия Endo III с ДНК, были получены мутантные формы с заменами Lys120Ala и Asp138Ala. Анализ каталитической активности путем регистрации продуктов реакции с использованием радиоактивно-меченных ДНК-субстратов, содержащих остатки DHU и AP-сайт, показал, что обе мутантные формы не проявляют ферментативной активности. Вместе с тем, было установлено, что указанные замены имеют принципиально разное влияние на взаимодействие с ДНК: мутантная форма Endo III K120A обладает способностью связываться с ДНК, а замена D138A приводит к полному блокированию связывания. В результате был сделан вывод, что Lys120 принимает участие не только в каталитическом процессе, но также важен при образовании первичного комплекса с ДНК и последующего узнавания повреждения, поскольку замена K120A значительно замедляет конформационные изменения ДНК. Кроме того, было показано, что замена каталитического остатка E2Q у Endo VIII сопровождается потерей лишь N-гликозилазной, но не AP-лиазной активности.

При исследовании взаимодействия Endo VIII с ДНК была поставлена задача определения очередности встраивания в ДНК-дуплекс аминокислотных остатков фермента. Для решения этой задачи было выделено несколько мутантных форм фермента, содержащих замены аминокислотных остатков Tyr71, Phe121, Phe230 и Pro253 на Trp, что позволило повысить чувствительность флуоресцентного сигнала и наблюдать конформационные изменения вблизи новых остатков Trp. Дополнительно остаток Leu70 был заменен на Ser. Анализ активности полученных мутантных форм Endo VIII показал, что наиболее сильное влияние на активность фермента оказывают замены Leu70. Мутантные формы L70W и L70S практически теряли способность катализировать расщепление AP-сайтов, и обладали слабой активностью по отношению к DHU-субстрату. Замены остальных аминокислотных остатков не приводили к значительному снижению активности фермента. Помимо этого для установления этапов ферментативного

процесса, на который могла бы повлиять замена каталитического остатка Glu2, была сконструирована мутантная форма Endo VIII E2Q. При взаимодействии фермента Endo VIII WT и его мутантной формы E2Q со всеми использованными ДНК-дуплексами наблюдалось изгибание ДНК уже на этапе образования неспецифического комплекса.

Анализ данных, полученных при исследовании взаимодействия Endo VIII с немодифицированной ДНК и ДНК-дуплексами, представляющими собой специфические субстраты: DHU, AP и F, - позволил предложить механизм реакции, включающий три стадии образования фермент-субстратного комплекса, очевидно, отражающие различные этапы связывания Endo VIII с ДНК, одну необратимую стадию, которую можно соотнести с каталитической стадией, и одну обратимую стадию диссоциации комплекса фермент-продукт. Также Кладовой О.А. были рассчитаны значения изменения энтальпии и энтропии для этого взаимодействия.

Необходимо отметить, что термодинамические параметры быстропротекающих стадий взаимодействия ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII с ДНК-субстратами получены в этой работе впервые. Установлено, что затраты энергии на образование каталитически компетентных состояний фермент-субстратных комплексов, компенсируются за счет увеличения энтропии, вероятно, вследствие дегидратации области контакта фермента с ДНК-субстратом.

В главе «Заключение» автором подведены итоги исследования. В последнем разделе диссертации отмечается, что в работе установлена последовательность элементарных стадий взаимодействия ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII из *E.coli* с ДНК-субстратами и изучена конформационная динамика ферментов и ДНК, предложены кинетические схемы и получены термодинамические параметры быстропротекающих стадий взаимодействия ферментов с субстратами. Прделанная Кладовой О.А., несомненно, приближает нас к пониманию механизма системы репарации оснований в ДНК, что еще раз подчеркивает актуальность и необходимость этой работы.

Выводы диссертационного исследования Кладовой О.А. полностью соответствуют поставленной цели и задачам, что свидетельствует о законченности работы.

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоит в определении цели и задач исследования, разработки подходов для их решения. Непосредственно автором проведен анализ литературы, выполнены исследования, проведена обработка и обобщение результатов, подготовлены публикации по теме диссертации, написана и оформлена рукопись.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. В диссертационной работе Кладовой О.А. получены исчерпывающие данные о конформационной динамике молекул ферментов Endo III и Endo VIII и ДНК-субстратов. Сопоставление полученных данных с известными рентгеноструктурными данными позволили предложить молекулярно-кинетическую модель взаимодействия Endo III и Endo VIII с ДНК, установить роль отдельных аминокислотных остатков в ферментативном процессе, и определить термодинамические параметры отдельных стадий взаимодействия ферментов с ДНК. Полученные в диссертационной работе результаты могут быть использованы в курсах лекций по биохимии и молекулярной биологии на биологических, химических и медицинских факультетах ВУЗов.

По содержанию и оформлению диссертации принципиальных замечаний нет. Следует, однако, отметить два момента в работе, которые вызывают некоторые вопросы. Так, в качестве немодифицированной ДНК использован дуплекс, содержащий напротив гуанозина объемный остаток флуорофора 1,3-диаза-2-окософеноксазина, обозначенный tC°. Во-первых, возникает вопрос, почему при изучении ферментов, узнающих окисленные пиримидины, использован дуплекс, содержащий в исследуемом положении пурин? Во-вторых, понятно, что два расположенных друг напротив друга объемных остатка могут существенно нарушать структуру двойной спирали ДНК, однако, этот вопрос никак не изучен в работе. В принципе нарушение структуры ДНК может приводить к «неправильному» восприятию такой ДНК ферментами систем репарации. И действительно, в работе отмечено, что связывание Endo III с неповрежденным

G₂-aPu/G12-лигандом не вызывало значительного изменения интенсивности флуоресценции остатка 2-aPu, а при регистрации неспецифического связывания Endo III с дуплексом G/tC⁰17, содержащим остаток гуанина напротив флуорофорной группы, наблюдали несколько фаз изменения интенсивности флуоресценции. Вторым вопросом связан с разделом, в котором исследовано взаимодействие мутантных форм Endo III Lys120Ala и Asp138Ala с ДНК. Здесь Кладовой получен принципиально важный результат о том, что мутантная форма Endo III K120A каталитически неактивна, но обладает способностью связываться с ДНК, а замена D138A не активна и на стадии связывания. Этот результат получен с использованием метода «остановленного потока», но учитывая его важность, стоило бы подтвердить его и другими методами, например, «торможения в геле».

Отмеченные пожелания не снижают общей положительной оценки диссертационной работы Кладовой О.А., которая вносит вклад в понимание механизма узнавания окислительных повреждений в ДНК ДНК-гликозилазами Endo III и Endo VIII, принадлежащими к разным структурным суперсемействам.

Заключение

Диссертация Кладовой Ольги Алексеевны на тему: «Конформационная динамика ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII в процессе взаимодействия с ДНК», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия», является законченной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, актуальной для современной биохимии. Результаты работы изложены чётко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. По всем критериям работа Кладовой О.А. удовлетворяет требованиям п. 9–11, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утверждённым Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года с изменениями и дополнениями, утверждёнными Постановлением Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор — Кладова Ольга Алексеевна

заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Отзыв обсуждён и одобрен на семинаре отдела химии нуклеиновых кислот НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» 16 мая 2019 г. (протокол № 5).

Главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
доктор химических наук, профессор
Готтих Марина Борисовна



20.05.2019

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40
тел.: +7(495)939-54-07, e-mail: gottikh@belozersky.msu.ru

Заместитель директора по научной работе
Научно-исследовательского института
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
академик РАН
Богданов Алексей Алексеевич

