



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

Г
УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
"Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской
академии наук",
член-корреспондент РАН, профессор,
доктор химических наук



Попов В.О.

2018 г.

31. 01. 2018 № 12307-2171-105
На № 15309-17/176/5 от 15.12.2017

ОТЗЫВ

Г
ведущей организации – Федеральное государственное учреждение
"Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук" – на диссертационную работу
Кузнецова Никиты Александровича «Молекулярно-кинетические механизмы
узнавания и удаления повреждений ДНК в процессе эксцизионной репарации
оснований», представленную к защите в диссертационный Совет по защите
докторских и кандидатских диссертаций (Д 003.045.01 на базе Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН) на соискание ученой степени
доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Актуальность темы и научная новизна диссертационной работы

Диссертационная работа Н.А. Кузнецова посвящена актуальной проблеме –
изучению молекулярно-кинетических механизмов узнавания и удаления повреждений
ДНК ферментами системы репарации, а именно ДНК-гликозилазами и AP-
эндонуклеазами.

Известно, что клеточная ДНК в процессе своего функционирования постоянно
подвергается воздействию различных факторов, которые могут приводить к ее
повреждениям. Окисление, алкилирование, дезаминирование, гидролиз N-гликозидных
связей, образование разрывов рибозо-фосфатного остова и сшивки цепей – это неполный
спектр процессов, приводящих к повреждению ДНК. Для противостояния процессу
накопления повреждений в ДНК каждый живой организм имеет специализированную
систему защиты ДНК от повреждений – систему репарации ДНК. Ферменты системы
репарации играют важную роль в сохранении целостности ДНК и выполняют

ответственную функцию в процессе жизнедеятельности любого организма, что делает их актуальными объектами исследований.

Несмотря на то, что процессы удаления повреждений в ДНК изучаются на протяжении десятков лет, важнейшие аспекты функционирования ферментов репарации ДНК остаются невыясненными. Многие поврежденные азотистые основания лишь незначительно отличаются по структуре от нормальных оснований и практически не нарушают строения двойной спирали ДНК. Тем не менее, до сих пор неизвестно, каким образом происходит поиск поврежденных участков ДНК среди огромного избытка неповрежденной ДНК. Не установлено, каким образом происходит молекулярное распознавание повреждения ферментами. Не установлен механизм, обеспечивающий высокую селективность и субстратную специфичность ферментов репарации к своим субстратам. Для ответов на эти вопросы и выявления ключевых стадий узнавания повреждений в ДНК необходимо проводить анализ конформационной динамики в процессе специфического фермент-субстратного взаимодействия.

Действительно, в настоящее время понимание механизмов ферментативных реакций в основном базируется на статических структурных данных, получаемых из рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии, данных стационарной кинетики, позволяющих сравнить специфичность фермента к субстратам и скорость их превращения и анализа строения интермедиатов и продуктов превращения субстратов. Однако установив структурными методами совокупность процессов, которые должны произойти для образования каталитического комплекса, остается совершенно непонятной последовательность этих событий, природа взаимодействий на начальных стадиях узнавания субстрата, природа стадий, обеспечивающих специфичность фермента и эффективную дискриминацию субстрата и «не субстрата». Поэтому актуальным направлением в современных исследованиях белково-нуклеиновых взаимодействий является анализ предстационарной кинетики и термодинамики ферментативного процесса с регистрацией конформационных превращений взаимодействующих молекул. В этой связи диссертационная работа Н.А. Кузнецова является своевременной и актуальной.

Диссертационная работа Кузнецова Никиты Александровича представляет собой завершенное исследование, в котором разработана и апробирована комплексная методология изучения механизмов узнавания повреждений ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК, основанная на кинетическом, термодинамическом и мутационном анализе изменений конформации ферментов и ДНК в режиме реального времени, и проведено систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов процессов, катализируемых рядом про- и эукариотических ферментов

системы репарации ДНК, ответственных за сохранение стабильности генетической информации живых организмов.

Таким образом, Кузнецовым Н.А. на мировом уровне проведено актуальное научное исследование, имеющее существенное значение для проблемы функционирования защитно-репарационного комплекса живых организмов и понимания молекулярной природы элементарных стадий взаимодействия ферментов репарации с поврежденной ДНК.

Структура диссертации

Диссертация построена по традиционному типу: введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 286 страницах, содержит 110 рисунков, 29 схем и 31 таблицу. Библиография включает 508 литературных источников.

Во введении четко очерчены значимость исследования и представлены его задачи. Литературный обзор посвящен описанию основных путей возникновения химической модификации азотистых оснований ДНК в живых клетках и ферментативному пути, отвечающему за узнавание и удаление необъемных повреждений – эксцизионной репарации оснований. Особенно тщательно диссертант изложил структурную классификацию ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеаз, которая направлена на выяснение общих закономерностей узнавания повреждений этими ферментами. Обзор содержит краткое заключение, которое обеспечивает переход от литературных данных к нерешенным задачам. Следует отметить, что в обзоре литературы отсутствует описание современных подходов к изучению конформационной динамики. В силу того, что анализ конформационных превращений является одним из ключевых методов в диссертации, эту информацию необходимо было отразить в обзоре литературы.

Основная часть диссертации изложена весьма четко и структурирована по ферментам, принадлежащим к одному структурному семейству. Совокупность результатов, представленных в диссертации, показывает, что анализ конформационной динамики в процессах белково-нуклеиновых взаимодействий многогранен. Например, конформационные изменения фермента могут быть зарегистрированы по природным остаткам Trp. При этом сайт-направленное введение новых остатков Trp в определенное место в качестве маркера позволило, как сделать заключение о наличии конформационных изменений фермента в области данной конкретной аминокислоты, так и установить момент времени и стадию в механизме, на которой эта аминокислота принимает участие. Кроме того, использование мутантных форм ферментов, содержащих замены аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента или участки

связывания с субстратом, позволило определить функциональную роль этих остатков на различных стадиях превращения фермент-субстратного комплекса. Для регистрации конформационных превращений в ДНК-субстратах с целью использования наиболее флуоресцентно-чувствительных модельных систем проводили скрининг флуорофоров и их местоположения в ДНК-субстрате. При этом для регистрации локальных конформационных изменений в области поврежденного нуклеотида использовали флуоресцирующие аналоги азотистых оснований, которые оказывают минимальное влияние на структуру и стабильность ДНК-дуплексов, что позволяет расположить эти флуорофоры в непосредственной близости от специфического сайта в ДНК-субстратах. Более объемные флуоресцентные красители вводили через линкер с фосфатными группами или азотистыми основаниями и, как правило, использовали для формирования FRET-пары. Изменения FRET-сигнала позволили зарегистрировать стадии изгибания ДНК-субстратов и каталитические реакции, вследствие очень высокой чувствительностью к изменению расстояния между донором и акцептором флуоресценции.

В качестве замечания к этому разделу работы следует отнести то, что при анализе конформационных изменений ферментов автор не учитывает флуоресценцию природных остатков тирозина, которые также присутствуют во всех белках. Кроме того, спектры возбуждения флуоресценции некоторых флуорофоров имеют пересечения и, например, возбуждение остатков 2-аминопурина в ДНК-субстратах также приводит к возбуждению остатков триптофана белков. В работе недостаточно четко описано, проводился ли анализ пересечения спектров испускания флуорофоров для корректной интерпретации зарегистрированных изменений интенсивности флуоресценции.

Информативным подходом, использованным в работе, является постадийное усложнение субстрата. Переход от неповрежденного дуплекса ДНК, отражающего наиболее простые, неспецифические взаимодействия, к специфическому ДНК-субстрату, характеризующему полный ферментативный цикл, позволил выявить природу взаимодействий между реагирующими молекулами и соотнести их с взаимодействиями конкретных химических групп. Необходимо отметить, что при выборе модельных ДНК-субстратов автор не объясняет выбор последовательности и длины используемых ДНК-дуплексов. При этом установлено, что одной из ключевых стадий узнавания повреждения является локальное «плавление» ДНК-дуплекса. Таким образом, возникает вопрос проводился ли анализ влияния длины дуплекса и его последовательности на стадии узнавания повреждения.

Однозначно новым подходом, разработанным и использованным в работе, является определение термодинамических параметров быстропротекающих стадий

Термодинамический анализ основывался на исследовании ферментативных процессов методом остановленной струи с флуориметрической детекцией при различных температурах. Несмотря на общеизвестность самого принципа определения величин ΔH_0 и ΔS_0 равновесных процессов, в литературе до настоящего времени практически отсутствуют данные о применении такого подхода к многостадийным быстропротекающим процессам, возможно, вследствие трудоемкости получения и сложности обработки данных.

С помощью разработанной методологии впервые проведено систематическое исследование широкого круга ферментов репарации ДНК человека и *E. coli*, ДНК-гликозилаз, принадлежащих к разным структурным семействам, а также AP-эндонуклеазы, которая структурно и каталитически отличается от ДНК-гликозилаз. Сравнительное изучение механизмов про- и эукариотических ферментов является еще одной важнейшей отличительной особенностью диссертационной работы, позволяющей установить общие кинетические и термодинамические закономерности узнавания повреждения ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам.

Несмотря на фундаментальный характер основной части работы на основании полученных результатов разработан высокочувствительный метод определения активности одного из ключевых ферментов репарации ДНК – APE1. Разработанный подход к созданию специфических ДНК-зондов может быть расширен для определения активности других ферментов репарации ДНК, например ДНК-гликозилаз hOGG1, NEIL1 и AAG, выполняющих важную роль при удалении повреждений ДНК, с целью диагностирования уровня репарационно-защитного статуса конкретного организма. Кроме того, специфические ДНК-зонды могут быть использованы для быстрого, поточного поиска низкомолекулярных соединений, оказывающих селективное влияние на активность ферментов репарации ДНК. Например, ингибиторы данных ферментов могут быть использованы для уменьшения репарационной устойчивости организма и повышения эффективности химио- и лучевой терапии, направленной на повреждение ДНК.

В главе Заключение автор пытается обобщить использованную в работе методологию, провести сравнение механизмов и выявить общие закономерности специфического узнавания повреждений ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам. Возможно, эти разделы более уместно было бы разместить прямо в основном тексте.

Выводы диссертационной работы корректны и полностью обоснованы полученным экспериментальным материалом. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Значимость работы

Диссертационная работа Кузнецова Н.А является первым систематическим исследованием молекулярно-кинетических механизмов высокоэффективного специфического узнавания и удаления повреждений ферментами репарации ДНК человека и *E. coli*, принадлежащими к разным структурным семействам. Полученные в работе результаты позволили установить детальный механизм и выявить ключевые стадии узнавания повреждений в ДНК ферментами системы репарации и, тем самым, внесли значительный вклад в понимание процессов поддержания целостности ДНК живых организмов. Разработанная в диссертации комплексная методология может быть использована для изучения любых белково-нуклеиновых взаимодействий, а также белок-белковых взаимодействий и взаимодействий ферментов с низкомолекулярными лигандами и субстратами.

Результаты работы могут представлять интерес для Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского при МГУ им. М.В. Ломоносова, Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Института биохимии им. А.Н. Баха, Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Института молекулярной биологии и биофизики СО РАН, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Института биологии гена РАН, Института белка РАН, Института цитологии и генетики СО РАН, ГНЦ «Вектор», Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и других организаций, занимающихся исследованиями в области физико-химической биологии.

С учетом объема и качества проведенных исследований, актуальности, высокой научной и практической новизны диссертационная работа Кузнецова Н.А. является законченным научно-квалификационным исследованием, совокупность теоретических положений которого можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в решении важнейшей проблемы функционирования системы репарационно-защитного комплекса и сохранения генетической информации в живых организмах. Таким образом, диссертация полностью отвечает требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, описанным в пунктах 9-14 Постановления Правительства

РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 №842 с изменениями от 21.04.2016 № 335. Автор диссертации, Кузнецов Никита Александрович, безусловно заслуживает присвоения ему искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв на диссертационную работу Кузнецова Никиты Александровича подготовлен профессором, доктором биологических наук Вейко Владимиром Петровичем, обсужден и утвержден на совместном заседании лаборатории молекулярной инженерии, лаборатории биотехнологии ферментов и лаборатории основ биотрансформаций Федерального государственного учреждения "Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук" 29 января 2018 г.

Главный научный сотрудник
лаборатории молекулярной инженерии,
доктор биологических наук, профессор



Владимир Петрович Вейко

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
Федеральное государственное учреждение "Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук"
(ФИЦ Биотехнологии РАН)
лаборатория молекулярной инженерии
Эл. почта: vladveiko@yahoo.com
Тел.: +7(495)514-7909