



## LABORATOIRE STABILITE GENETIQUE ET ONCOGENESE (UMR 8200 CNRS)

### ОТЗЫВ

**на автореферат диссертации Кузнецова Никиты Александровича «Молекулярно-кинетические механизмы узнавания и удаления повреждений ДНК в процессе эксцизионной репарации оснований», представленной на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.**

Жизнь клеточных организмов основывается на бесперебойном и строго координированном функционированием процессов жизнедеятельности. Протекание этих процессов на молекулярном уровне обеспечивается ферментативными системами организма, а носителем информации и источником регуляции и стабильности является ДНК. Накопление повреждений ДНК приводящих к мутациям в процессе жизнедеятельности клетки, как за счет внутренних сбоев метаболизма, так и за счет генотоксического воздействия внешних факторов, таких как повышенный уровень загрязнения окружающей среды, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, действие канцерогенных соединений, приводят к преждевременному старению, ускоренному развитию хронических заболеваний организма, опухолевой трансформации клеток что проявляется в клинике как широкий ряд сердечнососудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний.

В силу огромного размера генома человека ( $3,23 \times 10^9$  пар оснований) и химической нестабильности ДНК в одной клетке спонтанно возникает более 20 000 повреждений в день, то есть около 15 в минуту. Негативные внешние факторы, способствующие реакциям окисления, дезаминирования, алкилирования и разрывам цепей ДНК, могут увеличить это число в несколько раз.

Каждый живой организм имеет высоко-специализированную систему защиты геномной ДНК от повреждений сформировавшуюся в ходе длительной эволюции – систему репарации ДНК, состоящую из нескольких десятков ферментов, обладающих уникальной специфичностью к различным повреждениям ДНК. Нарушение функционирования этой системы ослабляет защиту организма в борьбе с повреждениями ДНК и значительно ускоряет появление проблем, связанных с накоплением мутаций в геноме.

В этой связи диссертационная работа Н.А. Кузнецова направленная на систематическое исследование механизмов специфического узнавания ферментами репарации ДНК поврежденных нуклеотидов и их последующего удаления из ДНК является своевременной и актуальной. Существенный вклад в понимание механизмов специфического фермент-субстратного взаимодействия могут внести исследования предстационарной кинетики процесса с регистрацией конформационных переходов ферментов и ДНК-субстратов. Поэтому актуальным направлением в современных исследованиях белково-нуклеиновых взаимодействий является анализ кинетики различных этапов реакции и термодинамики ферментативного процесса с регистрацией конформационных превращений взаимодействующих молекул в режиме реального времени.

Представленные в работе данные показывают, что анализ конформационной динамики многогранен. Конформационные изменения ферментов регистрировались по аминокислотным остаткам триптофана Trp, в некоторых случаях были получены мутантные формы ферментов, содержащие дополнительный остаток Trp, введенный в определенное место в качестве маркера. Кроме того, активное использование мутантных форм ферментов, содержащих замены функциональных аминокислот позволило выяснить и детализировать их роль в определенном моменте ферментативного процесса. Для регистрации конформационных изменений ДНК в работе использовали различные флуорофоры, введенные в состав модельных ДНК-субстратов.

Используя кинетический, термодинамический и мутационный анализ и разумно приспособиваясь к особенностям каждого фермента, автор последовательно продвигался к созданию молекулярно-кинетических моделей взаимодействия исследуемых ферментов с ДНК-субстратами на основе анализа данных, полученных при регистрации конформационных изменений фермента и ДНК, происходящих в процессе их взаимодействия, и рентгеноструктурных данных.

Несомненной новизной представленной работы является заключение о том, что для ферментов-представителей разных структурных семейств, обладающих разной субстратной специфичностью и типом катализа, существуют общие молекулярно-кинетические и термодинамические особенности узнавания специфических модификаций в структуре ДНК. Однозначно новым подходом является определение термодинамических параметров быстропротекающих стадий. Данный подход основан на анализе конформационной динамики биополимеров в процессе их взаимодействия при разных температурах. Фактически такой подход является уникальной методической разработкой лаборатории и задает новое научное направление в физико-химической биологии. Также хорошим примером области для практического применения полученных данных является разработка и апробация высокочувствительного метода определения активности одного из ключевых ферментов системы репарации путем эксцизии ДНК оснований – AP-эндонуклеазы человека APE1.

Полученные в работе результаты являются достоверными, а заключение и выводы обоснованными. Автореферат достаточно полно отражает суть исследования.

Можно заключить, что в диссертационной работе 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. Тем самым, внесен значительный вклад в изучение молекулярно-кинетических механизмов сохранения первичной структуры ДНК в процессе передачи генетической информации при делении клеток в живых организмах, что можно квалифицировать как крупное научное достижение. Таким образом, по актуальности поставленных задач, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа отвечает требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней, предъявляемым к диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.



STABILITE GENETIQUE ET ONCOGENESE  
UMR 8200 CNRS  
INSTITUT DE CANCEROLOGIE GUSTAVE ROUSSY  
Pavillon de Recherche 2  
39 rue Camille Desmoulins  
94805 VILLEJUIF cedex  
Tél. : 01.42.11.5118/4235  
Fax : 01.42.11.5244/5008

Заведующий лабораторией «Репарация ДНК»  
Департамент UMR 8200 CNRS, Институт Густава-Росси  
Доктор биологических наук, профессор

М. Сапарбаев

22.02.2018

F-94805, Вильжуиф, Франция  
Тел: +33 1-42115404  
E-mail: [murat.saparbaev@gustaveroussy.fr](mailto:murat.saparbaev@gustaveroussy.fr)