

ОТЗЫВ

официального оппонента о 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.

Актуальность темы и научная новизна диссертационной работы

Репарация ДНК включает в себя сложную совокупность процессов, с помощью которых клетка идентифицирует и исправляет повреждения геномной ДНК. В клетках любого организма, в результате собственного метаболизма с его сложнейшей биохимией, связанной с синтезом высокоактивных продуктов, так и внешнего воздействия, например, УФ-облучения, действия активных форм кислорода и т.д., может происходить химическая модификация ДНК. Известно, что в геноме одной клетки человека спонтанно возникает более 20 000 повреждений в день. Поэтому, процессы репарации ДНК должны быть постоянно активны, чтобы противостоять любым повреждениям структуры ДНК. Считается, что по пути эксцизионной репарации оснований ДНК удаляется большинство необъемных повреждений азотистых оснований и апуриновые-апиримидиновые сайты (АР-сайты). Удаление одного повреждения требует действия как минимум четырех ферментов: специфической ДНК-гликозилазы, АР-эндонуклеазы, репарационной ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы. Ключевыми ферментами в этом цикле являются ДНК-гликозилазы – их задача быстро и точно определить местоположение модифицированного основания среди огромного количества неповрежденных оснований и инициировать процесс репарации. Продукты действия ДНК-гликозилаз являются субстратами апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы, которая путем гидролиза фосфодиэфирной связи, расположенной с 5'-стороны от АР-сайта, вносит разрыв в рибозо-фосфатный остов. Известно, что нарушения работы ферментов репарации ДНК вызывают тяжелые последствия в организме человека и часто ведут к возникновению рака и преждевременному старению. Клетки и нокаутированные животные, лишенные различных ДНК-гликозилаз, становятся более чувствительными к воздействию факторов, приводящих к повреждению ДНК. В то же время генно-инженерное удаление из клеток АР-эндонуклеазы приводит к их гибели, что свидетельствует о критической роли этого фермента в процессе восстановления неповрежденной структуры ДНК.

Несмотря на большой интерес к исследованию механизмов и выяснению природы высокой специфичности ферментов репарации, непонятным остается вопрос, каким образом они осуществляют поиск и узнавание поврежденных оснований в ДНК. Задача осложняется тем, что каждый организм имеет несколько ДНК-гликозилаз, которые специализируются на узнавании и удалении одного или нескольких поврежденных оснований. Например, у *E. coli* обнаружено восемь ДНК-гликозилаз, у человека – одиннадцать. В последние годы получено большое число данных о структурах ДНК-гликозилаз, их комплексов с интермедиатами и субстратами. Независимо от субстратной специфичности и типа каталитической активности ДНК-гликозилазы можно разделить на шесть структурных семейств основываясь на их структурной гомологии: NthH-GPD, H2tH, UDG, AAG, ALK и T4 Endo V. АР-эндонуклеазы гораздо менее многочисленны, чем ДНК-гликозилазы и делятся на два структурных семейства на основании сходства с прокариотическими ферментами: экзонуклеазой III (Exo III) и эндонуклеазой IV (Endo IV).

Несмотря на достигнутые успехи в области структурных и биохимических исследований некоторых ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеаз, существующих данных недостаточно для детального представления о механизмах поиска ферментами

поврежденных оснований и их последующего удаления из ДНК. Существенный вклад в понимание этих механизмов 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 предстационарной кинетики и термодинамики ферментативного процесса с регистрацией конформационных превращений взаимодействующих молекул. В этой связи диссертационная работа Н.А. Кузнецова является своевременной и актуальной и представляет собой логически построенное исследование, в котором были решены следующие задачи:

- Разработана комплексная методология изучения молекулярно-кинетических механизмов в ходе узнавания повреждений про- и эукариотическими ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК.

- Проведено систематическое исследование широкого круга ферментов репарации ДНК человека и *E. coli* – ДНК-гликозилаз, принадлежащих к двум разным структурным семействам HhH-GDP и H2tH, и AP-эндонуклеазы в ходе полного ферментативного цикла взаимодействия с ДНК-субстратами разной степени специфичности. Для этого проведен анализ конформационной динамики ферментов по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp белков дикого типа, а также мутантных форм ферментов, содержащих дополнительные остатки Trp, введенные методом сайт-направленного мутагенеза. Для выяснения природы конформационных переходов в молекуле ДНК использованы модельные системы ДНК-субстратов, содержащие флуоресцентные аналоги азотистых оснований, в том числе новые, а также FRET-красители.

- Проанализированы механизмы конформационной подстройки активных центров ферментов, входящих в одно структурное семейство; установить ключевые стадии ферментативных процессов, обеспечивающие высокую субстратную специфичность и ответственные за узнавание поврежденных нуклеотидов в ДНК, определить и детализировать функциональную роль отдельных аминокислотных остатков, входящих в активные центры и участки связывания субстратов.

- Установлены кинетические особенности узнавания повреждений ДНК ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам.

- Получены термодинамические параметры процессов с участием короткоживущих фермент-субстратных комплексов; выявлены термодинамические особенности трансформации фермент-субстратных комплексов.

- Разработана и апробирована тест-система для определения активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований и проведен скрининг потенциальных ингибиторов ферментов.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка 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. Целью настоящей работы являлось определение молекулярно-кинетических механизмов конформационных изменений ферментов и ДНК в ходе специфического узнавания повреждений в процессах, катализируемых про- и эукариотическими ДНК-гликозилазами и AP-эндонуклеазами и выявление общих закономерностей образования каталитически

активных комплексов ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам. Литературный обзор содержит довольно краткое описание основных путей возникновения химической модификации азотистых оснований ДНК в живых клетках, а также включает описание пути эксцизионной репарации оснований, отвечающего за узнавание и удаление необъемных повреждений. Основная часть литературного обзора посвящена описанию структурной классификации ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеаз, с целью выяснения общих закономерностей узнавания повреждений этими ферментами. Обзор содержит краткое заключение, которое обеспечивает переход от литературных данных к нерешенным задачам.

Глава результатов и их обсуждения начинается с изложения принципов исследования конформационной динамики в процессах белково-нуклеиновых взаимодействий, включающего описание особенностей и ограничения современных методов исследования. Фактически этот раздел описывает разработку комплексной методологии изучения механизмов узнавания повреждений ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК. Автор показывает, что выяснение механизмов узнавания повреждений в ДНК ферментами репарации представляет собой трудную и нетривиальную задачу, требующую применения широкого спектра методов исследования и использования различных подходов. Конформационные изменения фермента могут быть зарегистрированы с использованием как природных остатков Trp, так и с помощью сайт-направленного введения новых остатков Trp в определенное место в качестве маркера. Такой подход позволяет регистрировать конформационные изменения фермента в области данной конкретной аминокислоты и установить момент времени и стадию в механизме, на которой эта аминокислота принимает участие. Более 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 понимания того, что происходит в эти же самые моменты с ДНК, используются различные флуорофоры – аналоги азотистых оснований и FRET-пары красителей. Поскольку чувствительность конкретного флуорофора к конформационным изменениям может быть разной и зависеть от его местоположения в составе ДНК-субстрата, то в каждом отдельном случае требуется скрининг как флуорофоров, так и их расположения. При этом присутствие флуорофора в ДНК-субстрате не должно оказывать влияния на ферментативную активность. Поэтому анализ конформационной динамики биополимеров в процессе их взаимодействия требует обязательного проведения скрининга модельных систем и соответствующих контрольных экспериментов. Постадийное усложнение структуры субстрата от неповрежденного дуплекса к поврежденному позволяет выявить природу взаимодействий между реагирующими молекулами и соотнести их с взаимодействиями конкретных химических групп. Однозначно новым подходом, разработанным и использованным в работе, является определение термодинамики быстропротекающих стадий. Фактически этот подход основан на регистрации и последующем анализе конформационной динамики биополимеров в процессе взаимодействия при разных температурах.

Разработанная методология применена для восьми ферментов из разных структурных семейств. Соответствующие результаты структурированы в последующих разделах главы результаты и их обсуждение. Совокупность данных, полученных с использованием всех подходов и характеризующих конформационные изменения как ферментов и их мутантных

форм, так и модельных ДНК-дуплексов, содержащих модификации разной степени специфичности и различные флуорофоры, позволила установить детальные молекулярно-кинетические механизмы узнавания специфических сайтов в ДНК, образования каталитически компетентных комплексов и протекания химических стадий реакции. Кроме того, разработанная в работе методология может быть распространена для изучения не только ДНК-процессирующих ферментов, но и белок-белковых взаимодействий, а также взаимодействий ферментов с низкомолекулярными субстратами (пептидами, аминокислотами, нуклеотидами и т.д.) или низкомолекулярными соединениями, выступающим в роли ингибиторов или активаторов ферментативных процессов.

Также необходимо отметить, что на основании результатов, полученных в ходе исследований, разработан и апробирован высокочувствительный метод определения активности АР-эндонуклеазы человека АРЕ1. 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 лучевой и химиотерапии, направленной на повреждение ДНК.

В главе Заключение автор обобщает использованные подходы и проводит сравнение полученных результатов, что позволяет выявить общие закономерности специфического узнавания повреждений ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам.

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

Заключение

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. Показано, что образование каталитически компетентного состояния сопровождается взаимосвязанными последовательными конформационными перестройками взаимодействующих молекул. Для каждого исследованного структурного семейства установлены общие принципы узнавания повреждения. Показано, что существуют общие процессы характерные для разных структурных семейств. Благодаря проведенным исследованиям складывается понимание принципов узнавания специфического сайта в ДНК разными ферментами. Данные, впервые полученные в работе, свидетельствуют о том, что система специфического узнавания поврежденного участка ДНК основана на процессе вклинивания аминокислоты-сенсора в ДНК-дуплекс, дестабилизированный за счет контактов в ДНК-связывающем центре фермента. 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.

Диссертационная работа Кузнецова Никиты Александровича представляет собой законченное исследование и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», так как в ней разработана комплексная методология изучения механизмов узнавания повреждений ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК и проведено систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов процессов, катализируемых рядом ферментов системы репарации ДНК. В совокупности полученные результаты и сделанные на их основе выводы, направленные на решение важнейшей проблемы сайт-специфического высокоэффективного узнавания повреждений ферментами репарации ДНК, можно квалифицировать как крупное научное достижение в области функционирования системы репарационно-защитного комплекса и сохранения генетической информации в живых организмах. Кузнецов Никита Александрович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Заведующий Лабораторией аналитической биоорганической химии

Лимнологического института СО РАН

Доктор биологических наук, профессор



С. И. Беликов

Беликов Сергей Иванович

664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, д. 3

Тел.: +7 (3952) 51-18-74

E-mail: belikov@lin.irk.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

Д.б.н., проф., зав. Лабораторией аналитической биоорганической химии

Подпись С. И. Беликова заверяю:

Ученый секретарь Лимнологического института СО РАН



Н. В. Максимова