

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора химических наук Марины Борисовны Готтих
на диссертационную работу Кузнецова Никиты Александровича
«Молекулярно-кинетические механизмы узнавания и удаления повреждений ДНК в
процессе эксцизионной репарации оснований»,
представленную на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности
03.01.04 – «биохимия»

Одним из основополагающих вопросов современной биологической науки является вопрос о механизмах специфического фермент-субстратного взаимодействия. Специфичность ферментативных реакций, организация структуры фермент-субстратного комплекса, возможность влиять на направление и эффективность реакции – все эти вопросы исследуются в различных лабораториях во всем мире. Особое место среди всех ферментативных реакций занимают реакции, протекающие в организме человека, поскольку понимание их механизмов в норме и при патологиях открывает широкие возможности для разработки новых методов лечения различных заболеваний. Актуальность работы Кузнецова Н.А. определяется как раз тем, что в ней исследуются механизмы функционирования ферментов, осуществляющих в организме человека удаление поврежденных оснований из молекулы ДНК. Известно, что клеточная ДНК в процессе своего функционирования постоянно подвергается воздействию различных факторов, которые могут приводить к ее повреждениям. 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. Большинство повреждений азотистых оснований и апуринизванные/апириминизованные сайты (AP-сайты) удаляются из ДНК по пути эксцизионной репарации оснований. Удаление одного повреждения требует действия как минимум 4 ферментов: специфической ДНК-гликозилазы, AP-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. 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.

Работа Кузнецова Н.А. представляет собой систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов узнавания повреждений и их удаления ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК. В ходе работы разработана и использована комплексная методология изучения механизмов действия 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. Учитывая, что изменение структуры взаимодействующих молекул ДНК и белка происходит в миллисекундном и секундном диапазонах времени, для изучения этих изменений Кузнецовым Н.А. использованы методы предстационарной кинетики. Конформационные изменения фермента регистрировались по изменению флуоресценции остатков Trp, а для регистрации конформационных изменений ДНК использовались модельные ДНК-дуплексы, содержащие флуоресцирующие аналоги азотистых оснований. В работе Кузнецова Н.А. использован подход поэтапного усложнения структуры специфического сайта, который позволяет соотнести конформационные изменения фермента и ДНК с взаимодействиями конкретных остатков в процессе образования специфических фермент-субстратных комплексов. Для выяснения функциональной роли аминокислотных остатков, входящих в активный центр ферментов и/или участки связывания с субстратом, использовались соответствующие мутантные формы ферментов.

Надо отметить, что совокупность данных, полученных с использованием всех подходов и характеризующих конформационные изменения как ферментов, так и использованных модельных ДНК-дуплексов, в значительной степени позволила выяснить детальные молекулярно-кинетические механизмы узнавания специфических сайтов в ДНК, образования каталитически компетентных комплексов и протекания химических стадий реакции.

Диссертация Кузнецова Н.А. построена по стандартному принципу и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 508 ссылок. Содержание диссертации полностью соответствует специальности.

Во введении очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, практическая ценность, а также цель и задачи диссертационной работы. Обзор данных литературы самым непосредственным образом связан с темой диссертации и помогает читателю лучше понять выбор направления исследований и значимость проделанной диссертантом работы. В обзоре рассматриваются главные пути химической модификации ДНК в клетках и общие закономерности функционирования системы

эксцизионной репарации оснований. Основное внимание в обзоре уделено классификации ферментов, изучаемых в диссертации: ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеаз. Обзор написан хорошим литературным языком и, несмотря на небольшой размер (36 страниц), достаточно информативен. Единственное небольшое замечание касается не очень удачного описания работы AP-эндонуклеазы семейства Nfo. Так на стр. 41 указано, что «в комплексе Nfo с ДНК, содержащей F-сайт, рибозо-фосфатный остов дуплекса изогнут примерно на 90°, а поврежденный нуклеотид вывернут в активный центр фермента». Понятно, однако, что в случае F-сайта говорить о нуклеотиде нельзя, поскольку дуплекс содержит вместо нуклеотида остаток восстановленной рибозы, который и называется F-сайтом.

В экспериментальной части четко и подробно описаны многочисленные методики, использованные диссертантом в его работе для получения рекомбинантных белков и исследования их взаимодействия с модельными ДНК-дуплексами. В этом же разделе приведены структуры всех олигонуклеотидов и указаны структуры модифицированных нуклеозидов и флуорофоров. Возможно, это не лучший вариант размещения этих структур в работе, поскольку к ним постоянно приходится обращаться при чтении раздела «Результаты и их обсуждение», и это создает некоторое неудобство.

Раздел «Результаты и их обсуждение» по объему просто колоссален и состоит из пяти больших подразделов, первый из которых посвящен описанию основных принципов исследования конформационной динамики в процессах белково-нуклеиновых взаимодействий, а в последующих разделах непосредственно рассматриваются результаты, полученные Кузнецовым Н.А. при исследовании механизмов функционирования ДНК-гликозилаз двух семейств и AP-эндонуклеазы. В последнем разделе рассматриваются предложенные Кузнецовым Н.А. варианты практического применения полученных им данных о молекулярно-кинетических механизмах действия ферментов репарации.

В первую очередь диссертантом были изучены конформационные изменения ДНК-гликозилаз структурного семейства HhH-GPD и ДНК в процессе их взаимодействия. При этом основное внимание было уделено исследованию 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека hOGG1. Этот фермент обладает очень высокой специфичностью по отношению к 8-оксогуанину, катализируя реакцию гидролиза N-гликозидной связи и последующего β -элиминирования фосфатной группы от 3'-атома углерода апуринизованного остатка рибозы. В соответствии с подходом поэтапного усложнения структуры специфического сайта, методами предстационарной кинетики Кузнецовым Н.А. было исследовано

взаимодействие фермента дикого типа и его мутантных форм с ДНК-субстратом, а также дуплексами, содержащими AP-сайт, F-сайт и не содержащими никаких модификаций. Помимо этого, для уточнения механизма расщепления поврежденной ДНК проводился масс-спектрометрический анализ реакционной смеси через определенные промежутки времени. Этот анализ позволил определить характерные времена образования и исчезновения ковалентных промежуточных комплексов фермента и ДНК в виде основания Шиффа. Совокупный анализ масс-спектрометрических данных, термодинамических параметров и данных мутационного анализа позволил Кузнецову Н. А. сделать вывод о том, что первой стадией взаимодействия 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы с ДНК является образование неспецифического комплекса, сопровождающееся «плавлением» цепей ДНК-дуплекса. На этой стадии происходит сканирование структуры ДНК на наличие повреждения, в котором основную роль играет остаток Tyr203. На второй стадии образуется связь между остатком His270 и фосфатной группой поврежденного нуклеотида, что способствует переходу ohoGua в активный центр фермента, где он формирует стэкинг с ароматическим кольцом Phe319. На этой же стадии происходит внедрение остатков Arg154, Arg204 и Asn149 в спираль ДНК на место вывернутого из спирали ohoGua. Последняя, третья стадия узнавания приводит к формированию каталитически компетентной конформации 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1, в которой осуществляются локальные перегруппировки, необходимые для осуществления гидролиза N-гликозидной связи. После этого происходят каталитические стадии ферментативного процесса, и диссоциация комплекса фермент-продукт завершает ферментативный цикл. При этом скоростью-лимитирующей стадией является реакция β -элиминирования.

Для подтверждения описанного механизма взаимодействия 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 с ДНК-субстратом Кузнецовым Н.А. были проведены исследования других представителей семейства ДНК-гликозилаз HhH-GPD: MutY, MBD4 и Nth. Надо отметить, что эти ферменты имеют значительные структурные отличия и разную субстратную специфичность. Кузнецовым Н.А. для указанных ДНК-гликозилаз были сконструированы подходящие варианты ДНК-субстратов и ДНК-лигандов и с их использованием получены концентрационные серии, установлены кинетические схемы взаимодействия и рассчитаны значения констант скорости, входящие в эти схемы. Проведенный анализ кинетических данных показал, что, как и для hOGG1, у ферментов MutY, MBD4 и Nth образование каталитически компетентного комплекса протекает через последовательность стадий, сопровождающихся изменением конформации молекул белка и ДНК. Взаимодействие можно разбить на два ключевых этапа: этап первичного

неспецифического связывания и этап образования специфических контактов и узнавания повреждения. На этапе неспецифического связывания зондирование тонкой структуры ДНК и поиск поврежденного основания осуществляется при помощи аминокислотного остатка-сенсора (Tyr203 у hOGG1, Leu81 у Nth, Tyr88 у MutY и, возможно, Leu508 у MBD4). Затем происходит вклинивание аминокислоты-сенсора в структуру двойной спирали, которое инициирует выворачивание поврежденного основания из цепи ДНК и последующую подстройку конформации фермент-субстратного комплекса для достижения каталитически компетентного состояния.

Второй группой ферментов, изученных в работе Кузнецова Н.А., стало семейство H2tH ДНК-гликозилаз, включающее гомологичные ферменты, имеющие структурное и функциональное сходство с формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой (Fpg или MutM) и эндонуклеазой VIII (Endo VIII или Nei). Фермент Fpg способен удалять широкий спектр модифицированных пуринов и имеет высокую специфичность к oхoG и Fapy производным Gua и Ade. Кроме того, Fpg удаляет различные окисленные пиримидины: 5-оксицитозин и 5-оксиурацил, продукты кольцевой фрагментации тимина, тимингликоль и 5,6-дигидротимин. ДНК-гликозилаза Nei удаляет из ДНК окисленные пиримидины. Все ДНК-гликозилазы семейства H2tH состоят из двух доменов, соединенных гибким линкером и используют в качестве каталитически активного нуклеофила N-концевой аминокислотный остаток Pro1, исключение составляет NEIL3, использующий Val1. Основное внимание было уделено Кузнецовым Н.А. изучению конформационных изменений эндонуклеазы VIII Nei, которая является одной из основных ДНК-гликозилаз в прокариотических клетках и удаляет из ДНК широкий набор окисленных или восстановленных пиримидиновых оснований. Для определения природы процессов, происходящих на стадиях формирования специфичного фермент-субстратного комплекса, в рамках диссертационной работы в первую очередь регистрировались конформационные изменения ДНК. Для этого Кузнецову Н.А. пришлось провести серьезную работу по оптимизации структуры модельного дуплекса и выбрать такую структуру и расположение флуоресцентной метки, которые бы не нарушали работу фермента. Регистрация флуоресценции Tgr и флуорофоров в ДНК позволила выявить сопряженную конформационную динамику фермента и ДНК в ходе ферментативного процесса и детализировать природу стадий узнавания повреждения. В результате была получена совокупность данных, характеризующих конформационные изменения фермента и ДНК-субстратов, на основании которых Кузнецовым Н.А. был предложен молекулярно-кинетический механизм узнавания повреждения ферментом Nei. Этот механизм получил свое подтверждение при изучении двух других ДНК-гликозилаз семейства H2tH:

формами допиримидин-ДНК-гликозилазы Fpg и эндонуклеазы VIII человека NEIL1. В результате было установлено, что все изученные про- и эукариотические члены данного структурного семейства осуществляют процесс узнавания поврежденного нуклеотида по общему механизму.

Помимо ДНК-гликозилаз Кузнецовым Н.А. было также изучено протекание ферментативной реакции с участием AP-эндонуклеазы человека (APE1). Учитывая, что APE1 является Mg^{2+} -зависимым ферментом диссертант в первую очередь выяснил влияние одно- и двухзарядных ионов металлов и pH на связывание ДНК и катализ. Далее с использованием дуплекса, содержащего F-сайт, Кузнецов Н.А. показал, что минимальный кинетический механизм взаимодействия APE1 с субстратом включает двухстадийное равновесное связывание, необратимое образование комплекса фермент-продукт и равновесную диссоциацию этого комплекса.

Практическая значимость работы Кузнецова Н.А. четко проявилась в последней части диссертации, посвященной разработке метода, позволяющего определить активность APE1 в биологических образцах, включая лизаты клеток, содержащих небольшое количество фермента. Разработка такого метода имеет большое значение для диагностирования уровня репарационно-защитного статуса конкретного организма. В рамках работы Кузнецова Н.А. был создан флуоресцентный ДНК-зонд, обладающий повышенной устойчивостью к неспецифическим эндо- и экзонуклеазам и позволяющий определять низкие концентрации APE1. Разработанный подход к созданию специфических ДНК-зондов может быть расширен для определения активности других ферментов репарации ДНК. Кроме того, специфические ДНК-зонды могут быть использованы для быстрого, поточного поиска низкомолекулярных соединений, оказывающих селективное влияние на активность ферментов репарации ДНК. Ингибиторы данных ферментов могут быть использованы для уменьшения репарационной устойчивости организма и повышения эффективности химио- и лучевой терапии, направленной на повреждение ДНК. Так в работе Кузнецова Н.А. найдено низкомолекулярное соединение, являющееся первым и единственным в мире ингибитором важнейшего фермента репарации человека hOGG1.

Все указанные выше результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. В работе Кузнецова Н.А. впервые проведено детальное сравнение про- и эукариотических ДНК-гликозилаз структурных семейств H2tH и HhH-GPD, а также AP-эндонуклеазы, структурно и каталитически отличной от ДНК-гликозилаз, показавшее, что процессы распознавания повреждений ДНК этими ферментами, включающие стадии изгибания ДНК, выворачивания поврежденного нуклеотида и встраивания

аминокислотных остатков ферментов в ДНК-дуплекс, имеют общие кинетические и термодинамические особенности. Показано, что высокая субстратная специфичность ферментов, относящихся к разным структурным семействам, и дискриминация поврежденных и неповрежденных нуклеотидов обеспечивается в результате последовательной взаимосогласованной подстройки конформации ферментов и ДНК в составе фермент-субстратных комплексов. В пределах каждого структурного класса определена функциональная роль аминокислотных остатков, входящих в активные центры ферментов.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 25 статьях и 2 патентах. Результаты работы докладывались на престижных российских и международных конференциях. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации. Все выводы диссертации хорошо обоснованы и их достоверность не вызывает сомнений.

Подводя итог, необходимо отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки диссертации. Вся работа очень хорошо структурирована, снабжена четкими и аккуратными рисунками и схемами и понятными, хотя и очень большими таблицами. Тем не менее, к работе есть несколько вопросов и замечаний. Так Кузнецов Н.А. для анализа конформационных изменений фермента и субстрата использует модельные дуплексы, содержащие в качестве флуорофоров нуклеозиды с модифицированными основаниями. Однако в работе нигде не указано, каким образом эти модификации могут влиять на структуру двойной спирали. Понятно, например, что присутствие 2-аминопурина напротив 8-оксо-гуанина в дуплексе должно существенным образом изменять структуру ДНК. Это, в свою очередь, может влиять на взаимодействие такой ДНК с ферментом репарации и приводить к не совсем точным результатам. Самое серьезное замечание относится к анализу взаимодействий 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 с ДНК. Кузнецов Н.А. отмечает, что этот фермент обладает очень высокой специфичностью по отношению к 8-оксогуанину, несмотря на то, что «он отличается от гуанина лишь двумя атомами». На самом деле это колоссальное отличие, которое очень серьезно меняет распределение электронной плотности в большой бороздке ДНК. В работе указывается, что фермент распознает это изменение, очевидно, с помощью остатка Tyr203. Скорее всего, в этом распознавании принимает участие ОН-группа тирозина. Недаром замена Tyr203Ala значительно инактивирует фермент. Фермент с заменой Tyr203Trp активен, возможно, за счет того, что функции ОН-группы тирозина выполняет NH-группа триптофана. Важность ОН-группы можно было проверить с помощью замены Tyr203Phe. Однако дальше в работе есть несколько непонятных

моментов. Так утверждается, что при связывании фермента hOGG1 с неповрежденным ДНК-дуплексом G/C_{12} «молекула фермента не претерпевает значительных конформационных перегруппировок при образовании первичного неспецифического комплекса с G/C_{12} . В то же время, значительный рост интенсивности флуоресценции аРи, зарегистрированный при использовании G^{aPu}/C_{12} дуплекса, однозначно указывает на нарушение Уотсон-Криковских связей и/или стэкинга при образовании неспецифического комплекса фермент-ДНК». Предполагается даже, что «может происходить частичное выворачивание основания Gua из двойной спирали и его встраивание в экзо-сайт фермента». Получается, что при образовании неспецифического комплекса фермент-ДНК структура ДНК серьезно меняется, в то время как изменений в структуре фермента не происходит. Что же тогда вызывает изменение ДНК? Как происходит выворачивание основания, если фермент не принимает в этом участия? Более того, в работе С.М. Stenshaw с соавт. (ссылка 398) указывается, что в комплексе hOGG1 с неповрежденным ДНК-дуплексом, ковалентно закрепленном на некотором расстоянии от G-C пары, действительно происходит выворачивание гуанина, но при этом он располагается в том же сайте, что и 8-оксо-гуанин. Более того, структуры комплексов фермента с поврежденной и неповрежденной ДНК очень мало отличаются. Встраивание же гуанина в экзо-сайт, о котором говорит Кузнецов Н.А., происходит в комплексе hOGG1 с неповрежденным ДНК-дуплексом, ковалентно закрепленном прямо рядом с остатком гуанина (ссылка 396). В работе С.М. Stenshaw с соавт. (ссылка 398) авторы отмечают, что, возможно, расположение гуанина в экзо-сайте вызвано неправильной фиксацией фермента относительно субстрата. Расположение G в экзо-сайте показано на рис. 5в в автореферате. Однако этот рисунок явно неудачен, поскольку на нем два остатка Arg образуют водородные связи с N3 цитозина, комплементарного вывернутому G, а это невозможно, т.к. у этого атома азоте только одна неподеленная пара электронов и он может образовать только одну связь. Кроме того, возникают вопросы о структуре комплекса hOGG1 с ДНК, содержащей 8-оксо-гуанин. Так, на стр. 66 написано «аминокислоты Arg154 и Arg204 встраиваются в цепь ДНК и образуют водородные связи со стоящим напротив охoGua основанием Cyt». Аналогичная фраза есть на стр. 21 автореферата. В то же время, в подписи к рис. 14 в автореферате указано, что остатки аргинина, взаимодействуют с фосфатными группами комплементарной цепи ДНК. Так с чем же образуют связи остатки Arg154 и Arg204? И какие связи они образуют, водородные или ионные? Не стоит также писать, что аминокислотные остатки «встраиваются в цепь ДНК», речь же не идет об образовании олигонуклеотидопептидов. Далее на стр. 67 указано, что «ДНК связывается в канале фермента, имеющем

единственный положительно заряженный остаток His270, который образует водородную связь с 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида». Очевидно, имелось в виду образование ионной связи. Аналогичное замечание можно сделать относительно фразы на стр. 32 автореферата «происходит встраивание остатка Arg177 в ДНК-дуплекс со стороны большой бороздки и образование водородной связи с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от F-сайта». Если еще говорить о неудачных выражениях, то надо отметить часто встречаемое «вклинивание» аминокислотных остатков в дуплекс. Не очень понятно, что имеется в виду под «вклиниванием». Еще один вопрос касается исследования в работе Кузнецова Н.А. ДНК-гликозилаз семейства H2tH. Как указано в диссертации, все исследованные ферменты используют в качестве каталитически активного нуклеофила N-концевой аминокислотный остаток Pro1. Однако в рекомбинантных белках, полученных в работе из культуры *E. coli*, на N-конце должен присутствовать N-формилметионин, который, очевидно, не может выступать в качестве нуклеофила. Соответственно, непонятно, как осуществляется катализ. Хотелось бы, чтобы этот момент был как-то объяснен в работе.

Надо однако отметить, что все указанные недочеты никоим образом не снижают общего высокого уровня работы, которая, несомненно, является высококлассным научным исследованием.

В заключение необходимо отметить, что диссертация Кузнецова Н.А. является научно-квалификационной работой, в которой разработана комплексная методология изучения механизмов узнавания повреждений про- и эукариотическими ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК, основанная на предстационарном кинетическом, термодинамическом и мутационном анализе конформационных изменений ферментов и ДНК-субстратов. 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, и установлено, что ферменты обладают общими кинетическими особенностями распознавания повреждений ДНК, включающими стадии дестабилизации дуплекса, изгиба ДНК, выворачивания поврежденного нуклеотида и встраивания аминокислотных остатков активного центра ферментов в ДНК-дуплекс. Впервые проведен термодинамический анализ быстропротекающих процессов узнавания поврежденного нуклеотида. Сравнение термодинамических параметров равновесных стадий молекулярно-кинетических механизмов позволило выявить общие термодинамические особенности трансформации фермент-субстратных комплексов.

Работа представляет собой целостное и завершённое научное исследование, выполненное на очень высоком экспериментальном уровне. Результаты работы изложены чётко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. По актуальности поставленных задач, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа, представленная соискателем Кузнецовым Никитой Александровичем, полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент,
доктор химических наук, профессор,
главный научный сотрудник
отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательского института
физико-химической биологии имени
А.Н.Белозерского Московского государственного
университета имени М.В.Ломоносова

 /Готтих М.Б./

специальность 02.00.10 – биоорганическая химия
рабочий адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40
телефон: +7 495 939 5407
адрес электронной почты: gottikh@belozersky.msu.ru

Подпись заверяю
Директор НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова
академик РАН

 /В.П.Скулачев/

01.03.2018

