

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **КУЗНЕЦОВА НИКИТЫ АЛЕКСАНДРОВИЧА «МОЛЕКУЛЯРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ И УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ПРОЦЕССЕ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ»**, представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности «**03.01.04 – биохимия**»

Энзимология за последние 20-30 лет развивалась высокими темпами и в значительной степени сменила свой имидж. Если раньше понимание механизмов ферментативных реакций базировалось главным образом на данных стационарной кинетики и методов химии белка (афинная модификация и т.д.), то в настоящее время бурное развитие структурных методов позволило этой дисциплине обрести прочный фундамент на базе данных, получаемых из рентгеноструктурного анализа, ЯМР-спектроскопии и некоторых других физических методов, которые в ряде случаев позволяют оценить строение активных центров, связывание субстратов и эффекторов, а также предложить рациональные пути создания специфических ингибиторов или активаторов.

Безусловно, структурные методы внесли и вносят огромный вклад в понимание природы ферментативного катализа, но они в значительной степени являются ограниченными. Эти данные описывают лишь определенные, фиксированные состояния фермента и субстрата (лиганда) в процессе ферментативной реакции, ничего (или почти ничего) не говоря о последовательности событий, временных характеристиках переходов между стадиями и, наконец, роли конформационных переходов в обеспечении протекания реакции. Стационарная кинетика в большинстве случаев должным образом ответить на эти вопросы не может. Иными словами, современной энзимологии не хватает динамических характеристик. Между тем именно эти характеристики, в первую очередь данные о конформационных переходах в процессе ферментативной реакции являются, наряду с обсужденной выше структурной информацией, решающими при создании адекватных моделей ферментативного катализа. Одним из наиболее существенных вкладов в понимание этих вопросов вносят методы предстационарной кинетики и термодинамики ферментативного процесса с регистрацией конформационных превращений взаимодействующих молекул. Именно такого рода исследования и являются методической базой диссертации Н.А. Кузнецова, причем следует заметить, что исследования такого класса в отечественной науке встречаются нечасто.

В качестве объектов исследования конформационной динамики в процессах специфического узнавания субстрата в диссертационной работе использовались ферменты системы репарации ДНК, а именно ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы. Стабильность генома, обеспечением которой служит система репарации, является одним из основополагающих принципов передачи и хранения генетической информации. Для реализации этого принципа природа создала разветвленную систему защиты от многочисленных факторов, вызывающих разнообразные повреждения структуры ДНК. В клетках имеется значительное количество систем, распознающих эти повреждения,

сигнализирующих о своем присутствии и осуществляющих ликвидацию нарушений. Особое место при этом занимает так называемая эксцизионная репарация, в процессе которой специфические ферменты, а именно ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы производят замену «необъемного» поврежденного основания в составе ДНК. Исследования процессов, лежащих в основе процессов эксцизионной репарации, проводятся многие годы, однако многие ее аспекты, в том числе механизмы лежащих в основе репарации ферментативных реакций пока еще недостаточно изучены. Между тем понимание этих процессов является чрезвычайно важным, так как повреждения ДНК лежат в основе различных заболеваний, в первую очередь злокачественных перерождений клетки.

Таким образом, работа Н.А. Кузнецова является новой и актуальной с точки зрения сразу двух аспектов, как биологического – исследований тонких механизмов репарации – фундаментального биологического процесса, так и физико-химического – применения самых современных методов для исследований сложной молекулярной системы с полимерными компонентами.

Основной целью диссертационной работы Н.А. Кузнецова было определение молекулярно-кинетических механизмов конформационных изменений фермента 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.

Работа Н.А. Кузнецова построена по традиционному принципу, 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 рассматривается актуальность и важность выбранной темы. Автор обсуждает тематику работы в рамках современных проблем и достижений биохимии и физической химии. В качестве основной задачи диссертационного исследования была поставлена разработка комплексной методологии изучения молекулярно-кинетических и термодинамических механизмов в ходе узнавания повреждений про- и эукариотическими ДНК-гликозилазами, принадлежащих к двум разным структурным семействам, и AP-эндонуклеазами, основанную на предстационарном кинетическом, термодинамическом и мутационном анализе конформационных изменений ферментов и ДНК-субстратов, а также, в качестве дополнительной задачи, разработка и апробация тест-системы для определения активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований и проведения скрининга потенциальных ингибиторов этих ферментов.

В обзоре литературы, рассматриваются основные причины химической модификации ДНК и типы возникающих повреждений. Значительное внимание уделено эксцизионной репарации оснований. Основной массив обсуждаемых данных посвящен характеристикам (главным образом структурным) основных ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеаз из различных источников, особенностям катализируемых ими реакций и их первостепенная важность в

обеспечении стабильности генома. Единственным недостатком обзора, на мой взгляд, является определенная перегруженность структурной информацией. Чтение текста с перечислением тех или иных структурных элементов или аминокислотных остатков нескольких десятков ферментов все же несколько отличается от рассматривания одной-двух пространственных структур на экране компьютера. Впрочем, такая обильная информация скорее свидетельствует о добросовестности автора и не может быть поставлена ему в вину. В целом обзор хорошо структурирован, содержит удачные схемы и иллюстрации и написан хорошим научным языком и производит приятное впечатление.

Раздел «Экспериментальная часть» подробно описывает детали и инструментарий проведенных экспериментов. В исследовании использован широкий набор биохимических, физических и молекулярно-биологических методов исследования. Данный раздел свидетельствует о высокой квалификации и прекрасной методической подготовке Н.А. Кузнецова, с одной стороны, как ученого-экспериментатора, и, с другой стороны, как аналитика получаемых данных.

Глава «Результаты и их обсуждение» представляет собой итог работы Н.А.Кузнецова и содержит пять больших разделов, написанных четко и логично. В первом разделе описаны общие принципы исследования конформационной динамики в режиме реального времени. Автор приводит структуры модельных олигонуклеотидных субстратов, с которыми приводились кинетические эксперименты. В основу дизайна этих субстратов был заложен принцип поэтапного усложнения субстрата, сформулированный Г.А. Невинским несколько лет назад. Автор использовал несколько десятков таких субстратов, содержащих значительное число повреждений структуры, как природных, так и искусственных, адаптированных для анализа с помощью флуоресценции. При этом использовалась либо флуоресценция остатков триптофана в белках – природных, или введенных в подходящие позиции сайт-специфичным мутагенезом, либо флуоресценция объемных красителей, использованных для образования FRET-пар. Подробно описан математический аппарат, примененный для анализа данных предстационарной кинетики.

В качестве дискуссионного замечания к этому разделу можно поставить вопрос о соответствии коротких модельных субстратов природному – протяженной молекуле ДНК, содержащей повреждение. По моему мнению, механизмы связывания фермента с субстратом в этих двух случаях может существенно различаться, поскольку в случае высокомолекулярной ДНК будет неизбежно добавляться стадия «поиска» ферментом повреждения, которая может вносить изменения в кинетические параметры

Далее в разделах 2 и 3 автор описывает и обсуждает полученные результаты исследований конформационные изменений ДНК-гликозилаз двух структурных семейств (HhH-GPD и H2tH) и ДНК в процессе их взаимодействия. В разделе 4 обсуждаются соответствующие результаты, полученные для AP-эндонуклеаз. Автор провел колоссальную по объему работу с использованием 8 ферментов и 18 их мутантных форм и нескольких десятков субстратов, получил все необходимые кинетические кривые, на основании которых были определен массив индивидуальных кинетических констант и предложены кинетические

схемы для этих случаев. Наконец в разделе 5 описывается практическое применение данных о молекулярно-кинетических механизмах ферментов репарации, а именно разработка метода, позволяющего определить ферментативную активность в биологических образцах, включая лизаты клеток. Разработка таких методов, с одной стороны, имеет большое значение для диагностирования уровня репарационно-защитного статуса конкретного организма и, с другой стороны, для быстрого, поточного поиска низкомолекулярных эффекторов соответствующих ферментов, оказывающих влияние на эту активность.

В результате выполнения работы Н.А.Кузнецовым была 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 модельных ДНК-субстратов с детекцией по флуоресценции белка (остатки Trp ферментов дикого типа, а также их мутантных форм, содержащих остатки Trp, введенные методом сайт-направленного мутагенеза, либо по флуоресценции модельных олигонуклеотидных субстратов содержащих флуоресцентные аналоги азотистых оснований и/или FRET-красителей, и основанной на постадийном усложнении их строения. Использование других мутантных форм ферментов, содержащих замены функционально важных аминокислотных остатков, входящих в активный центр или участвующих в связывании субстратов, позволило в известной степени определять их функциональную роль на различных стадиях превращения фермент-субстратных комплексов. Автор также разработал подходы и с успехом оценил термодинамику быстропротекающих стадий, приводящих к узнаванию поврежденного нуклеотида.

Разработанные методы и подходы позволили автору впервые провести систематическое исследование ферментов репарации - ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеаз, из которого становится ясным, что элементарные стадии всех соответствующих ферментативных реакций сопровождаются взаимосвязанными последовательными конформационными перестройками взаимодействующих молекул. Н.А. Кузнецовым были установлены молекулярно-кинетические механизмы взаимодействия ферментов с ДНК-субстратами и количественно оценены ключевые стадии ферментативных реакций, обеспечивающие высокую субстратную специфичность и ответственные за узнавание поврежденных нуклеотидов в ДНК, а также детализирована функциональная роль отдельных аминокислотных остатков, входящих в активные центры и участки связывания субстратов. Выяснилось, что эти ферменты обладают общими кинетическими особенностями распознавания повреждений ДНК, включающими стадии дестабилизации дуплекса, изгибания ДНК, выворачивания поврежденного нуклеотида и встраивания аминокислотных остатков

активного центра ферментов в ДНК-дуплекс. Получен еще целый ряд первоклассных научных результатов.

В качестве общего замечания хотелось бы немного покритиковать диссертанта в присущей ему тенденции иногда достаточно смело объединять кинетические и структурные данные, когда некоей стадии реакции, выявленной с помощью кинетических методов, придается определенная структурная или химическая роль. Строго говоря, такие выводы все же относятся к весьма обоснованным, но все же предположениям. Впрочем, это замечание несколько не умаляет достоинств этой действительно прекрасной работы.

Сформулированные Н.А. Кузнецовым выводы работы основаны на результатах многочисленных экспериментов, причем в большинстве случаев автором взаимозаменяемые экспериментальные подходы, и тщательным математическим анализом полученных данных. В целом достоверность результатов работы и обоснованность выводов не вызывают сомнения.

В целом можно констатировать, что Н.А.Кузнецовым создан по существу новое научное направление, заключающееся в исследовании сложных систем ферментов генетического аппарата клетки с помощью методов предстационарной кинетики. Работы, выполненные ранее с помощью такого подхода, были достаточно разрозненными и не образовывали единой методологии. Н.А.Кузнецов придал исследованиям систематический характер, что дало прекрасные результаты.

Работа Н.А. Кузнецова хорошо оформлена, написана ясным научным языком и успешно проиллюстрирована. Содержание автореферата диссертации полностью соответствует содержанию работы. Исследование выполнено на высоком научном экспериментальном и теоретическом уровне. Подавляющее большинство полученных результатов являются абсолютно новыми и потому имеют высокую актуальность, фундаментальную значимость и научную новизну. С учетом важности проведенных исследований для медицины и фармацевтики высокая практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнений. Сделанные по работе замечания не носят принципиального характера и не влияют на основные результаты и выводы диссертации.

Основные результаты работы опубликованы в 27-ти статьях в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ, с высоким импакт-фактором. Материалы работы также были представлены на многочисленных международных и российских конференциях.

Таким образом, анализ диссертационной работы Н.А. Кузнецова свидетельствует о ее завершенности и разработке в рамках данного исследования ряда теоретических положений, которые в совокупности можно квалифицировать как новое крупное научное достижение. На основании научной новизны, высокой актуальности и теоретического и практического

значения полученных результатов считаю, что диссертационная работа «Молекулярно-кинети́ческие механизмы узнавания и удаления повреждений ДНК в процессе эксцизионной репарации оснований», полностью удовлетворяет требованиям Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор, Кузнецов Никита Александрович, заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности «03.01.04 – биохимия».

Заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений  
ФГБУН Институт молекулярной биологии  
имени В. А. Энгельгардта РАН  
член-корреспондент РАН,  
доктор химических наук, профессор



Кочетков Сергей Николаевич

*Подпись Кочеткова С.Н. удовлетворяет  
условиям сертификата члена РАН Бочаров А.М.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ФГБУН ИМБ РАН)

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Тел. +7(499) 135-05-90 email: kochet@eimb.ru



28 февраля 2018 г.