

О Т З Ы В

на автореферат диссертации
Попова Александра Викторовича

“МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ 8-ОКСО-ГУАНИН-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ БАКТЕРИЙ И ЧЕЛОВЕКА”

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.04 - биохимия.

Актуальность исследования. Исследование ферментов репарации является актуальным направлением современной молекулярной биологии. Работа Попова А.В. посвящена исследованию 8-оксо-гуанин-ДНК-гликозилаз — прокариотических и эукариотических ферментов, осуществляющих распознавание и удаление окисленных производных гуанина, вызванных активными радикалами кислорода. 8-оксо-гуанин является высокомутатогенным и цитотоксичным повреждением, а его накопление в геномной ДНК может быть причиной канцерогенеза и играет роль в старении. ДНК-гликозилазы Fpg и OGG1 специфически распознают и удаляют 8-охо-Г в паре с неповрежденным цитозином, но не аденином, что позволяет предупредить появление мутаций при застройке бреши в ходе репаративного синтеза ДНК. Механизмы распознавания и удаления 8-оксо-гуанин-ДНК-гликозилазами поврежденных оснований не достаточно изучены. Существенным ограничением для исследования механизмов катализа на молекулярно-атомном уровне является несовершенство существующих физико-химических методов исследования структур белков: сложность получения кристаллов высокого качества и невозможность исследования динамики процесса кристаллографическими методами. На фоне роста вычислительных возможностей компьютеров новым и перспективным методическим подходом для исследования энзимологических процессов является компьютерное моделирование. Однако, в этой области остро стоит проблема нехватки средств программного обеспечения. В рамках работы Попова А.В. решаются сразу две актуальные задачи: 1) исследуются структурные основы субстратной специфичности и каталитической активности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз методами классической ферментативной кинетики и компьютерного моделирования; 2) разрабатываются новые программные средства для моделирования методом молекулярной динамики. Таким образом, работа Попова А.В. отличается очень высокой актуальностью.

Оценка новизны и значимости полученных результатов. Работа обладает высокой научной новизной. Поповым А.В. разработаны новая программа и удобный графический пользовательский интерфейс программы, позволяющие осуществлять моделирование молекулярных каталитических процессов с помощью построения и анализа молекулярно-динамических траекторий. С использованием разработанной программы получены новые данные о структурных основах субстратной специфичности и механизме катализа 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз, в том числе динамические данные, позволяющие углубить знания о разных стадиях катализа. В частности, впервые исследованы состояния ионизации каталитических остатков Pro1 и Glu2 фермента Fpg; высказана и экспериментально подтверждена гипотеза о необходимости депротонирования Pro1 при катализе. Показано, что важную роль в распознавании основания, находящимся напротив 8-охо-Г, играют взаимодействия вне активного центра Fpg. Впервые изучен вклад молекул растворителя в формирование комплекса Fpg с ДНК-субстратом и продемонстрирована важная роль молекул воды в конформационной динамике и катализе. Показано, что ориентация ε-аминогруппы Lys249 является ключевым фактором каталитической активности OGG1, а замены Cys253 и Gln315 объемными

аминокислотными остатками приводят к падению каталитической активности OGG1 за счет деформации активного центра, а не изменения положения ДНК-субстрата. Полученные автором научные результаты обладают высокой научной значимостью и вносят важный вклад в понимание фундаментальных механизмов репарации повреждений, вызванными окислительным стрессом. Разработанные Поповым А.В. программные средства компьютерного анализа структуры и динамики биологических макромолекул и их комплексов по ряду параметров (*прежде всего, простоте использования*) превосходят существующие программы-аналоги. Эти разработки могут быть рекомендованы для широкого применения в энзимологических исследованиях с использованием методов молекулярной динамики.

Оценка достоверности полученных результатов. Работу отличает высокий научно-методический уровень и комплексный подход: работа выполнена с использованием классических методов биохимии и молекулярно-биологии в сочетании с методами компьютерного моделирования и современными технологиями программирования. Все научные выводы, полученные с помощью молекулярно-динамического анализа комплексов ДНК-гликозилаз с ДНК-субстратами, были подтверждены экспериментальными исследованиями с использованием рекомбинантных препаратов ДНК-гликозилаз. Полученные *in silico* данные полностью согласуются с результатами биохимических экспериментов *in vitro*. Представленные в работе исследования достоверны, выводы и заключения обоснованы.

Замечания.

- 1) При оформлении 2, 3 и 11 рисунков автореферата был использован мелкий, плохо читаемый шрифт.
- 2) Из текста автореферата не понятно, что автор подразумеваем под концепцией пластичности активного центра. Это следовало бы пояснить.
- 3) Положение о том, что причины падения каталитической активности мутантных вариантов OGG1 с объемными аминокислотными заменами остатков Cys253 и Gln315 заключаются в искажении структуры активного центра из-за его пластичности (стр. 3 автореферата), возможно, не очень корректно сформулировано. Из текста следует, что аминокислотные замены указанных остатков не вызвали бы структурных изменений активного центра, если бы он был непластичен. Однако, это не было показано (и, возможно, не может быть показано). Кроме того, исследуемые объемные аминокислотные замены сами по себе являются существенным структурным изменением независимо от пластичности.

Указанные замечания не являются существенными и не снижают высокого уровня научной ценности работы.

Заключение. Работа представляется актуальной, является законченным научно-исследовательским трудом и выполнена автором самостоятельно на высоком научном и методическом уровне. Автореферат достаточно полно отражает суть исследования и отвечает требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней. Автор Попов Александр Викторович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

зав. группой «Специализированные ДНК-полимеразы»
Института молекулярной генетики РАН (г. Москва)

к.б.н. Макарова А.В.

Подпись Макаровой А.В.
18.10.2017

удостоверено -
Исполнительный секретарь ИМГ РАН, к.б.н.

