

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию
на соискание ученой степени доктора химических наук**

Коваля Владимира Васильевича на тему:

**«Динамическая пластичность ДНК-гликозилаз и эндонуклеаз в
комплексах с ДНК: кинетические и структурные особенности»**

по специальностям 1.4.9. Биоорганическая химия и

1.5.3. Молекулярная биология

Диссертационная работа Владимира Васильевича Коваля направлена на установление механизма узнавания ДНК-субстратов и реализации каталитической функции ферментами репарации, в частности эксцизионной репарации оснований (ЭРО) и ферментами геномного редактирования. Для характеристики и обобщения механизмов ДНК-белкового узнавания использованы общие структурно-динамические подходы.

ЭРО является важным элементом системы метаболизма ДНК в клетках, обеспечивая сохранение генетической информации, а также нормальную работу всех систем клеточного метаболизма в процессе реализации геномной информации. В последнее время стало очевидным, что именно процесс репарации ДНК может влиять на эффективность различных терапевтических агентов в процессе лечения онкологических заболеваний. К настоящему моменту часть изучаемых в работе ферментов: AP-эндонуклеаза 1 человека (APE1), 8-оксогуанин-ДНК гликозилазы: *E. coli* (Fpg) и человека (OGG1), достаточно хорошо структурно исследованы методами стационарной кинетики, а также методами рентгеноструктурного анализа (РСА). Для других объектов исследования: эндонуклеазы Apr1 из дрожжей *S. cerevisiae* и эндонуклеазы NEIL2 человека до настоящего момента не получены 3D-структуры.

Автор диссертации предложил использовать при изучении динамики ДНК-белковых комплексов составной подход, включающий изучение кинетических характеристик взаимодействия между ферментом и ДНК-субстратом, моделирование комплексов с помощью молекулярной динамики и использования масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена для получения динамических структур. Используемый подход позволил достаточно подробно на структурном уровне описать динамическую подвижность изучаемых комплексов биополимеров. Таким образом, актуальность и практическая значимость представленной диссертационной работы Ковалева В. В. не вызывает сомнений.

Научная составляющая диссертационной работы

В настоящей диссертационной работе на основании полученных данных о конформационных переходах в ферментах и ДНК-субстратах установлены кинетические механизмы обнаружения и превращения поврежденных участков ДНК для эукариотических ферментов репарации: AP-эндонуклеаз APE1 человека и Ape1 из *Saccharomyces cerevisiae* (как природных форм, так и функциональных мутантов), принадлежащих к двум разным семействам ExoIII и Endo IV; для ДНК-гликозилаз Fpg и OGG1 (природных форм и функциональных мутантов); для эндонуклеаз NEIL2 и Cas9. Получены новые данные об особенностях элементарных стадий, относящихся к узнаванию и связыванию нуклеиновых кислот (НК) ферментами, за счет исследования белков, несущих аминокислотные замены; полученные знания позволяют описать структурно-динамические механизмы узнавания ферментами ДНК на атомарном уровне.

Практическая ценность результатов, полученных в работе

В настоящее время практически любые терапевтические подходы используют химические агенты, так или иначе взаимодействующие с компонентами клетки. В частности, в терапии онкологических заболеваний, наряду с новыми щадящими препаратами таргетной терапии

и стратегиями используются химически активные соединения, повреждающие ДНК. Именно на этом действии базируется терапевтический эффект подавления онкотрансформированных злокачественных клеток, так как активное деление блокируется из-за невозможности репликации такой поврежденной ДНК. Этот эффект нивелируется действием систем репарации ДНК. Знание деталей кинетических механизмов работы ферментов ЭРО и, в частности APE1 и OGG1, абсолютно необходимо для разработки опухоль-специфических ингибиторов процессов репарации для повышения эффективности действия существующих препаратов.

Личный вклад автора четко сформулирован и является определяющим в выносимых на защиту результатах.

Анализ диссертации как завершенной научно-исследовательской работы

Диссертационная работа состоит из традиционных разделов: «Введение», «Обзор литературных данных», «Материалов и методов», «Результатов и их обсуждения». Работа изложена на 253 страницах, содержит 75 рисунков, 7 схем и 16 таблиц. Библиография включает 297 литературных источников.

В разделе «Введение» дается лаконичный, сжатый, но исчерпывающий анализ исследуемой проблемы, четко фокусируются цели по установлению механизма узнавания ДНК-субстратов и реализации функции исправления повреждений ферментами репарации и конкретные задачи исследования.

В разделе «Обзор литературных данных» представлен очень хороший анализ существующих на сегодняшний день данных о структурах и функциях 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека OGG1. Диссертант тщательно и вдумчиво систематизировал и проанализировал весь огромный массив данных посвященных самым различным аспектам деятельности данного фермента, как в биологическом плане, так и в

детальном химическом и физико-химическом механизме поиска, распознавания и каталитической реакции hOGG1 с ДНК, содержащей 8-оксо-G, AP-сайт и их аналоги. Данный раздел написан четко, ясно и стилистически грамотно, читается легко и увлекательно. По ходу изложения в разделе приводятся прекрасные информативные иллюстрации, что, несомненно, повышает ценность анализируемой информации. В конце раздела Коваль В. В. приводит заключение к данному разделу, в котором дается обобщение литературных данных и четко формулируются основные положения предлагаемой экспериментальной работы.

«Материалы и методы» отражают проведенные эксперименты.

В разделе «Результаты и обсуждение» результаты изложены четко, понятно и обоснованно. Полагаю, что залогом успеха данной работы стал хорошо продуманный, разработанный и осуществленный экспериментальный дизайн, включающий как структуру используемых олигонуклеотидов, так и современную методологию исследования кинетических параметров методом предстационарной кинетики «остановленного потока», позволяющей оценивать параметры кинетического механизма, начиная с миллисекундного диапазона. В результате анализа литературных данных были подобраны такие размеры используемых модельных субстратов для ферментов репарации ДНК, которые и позволили избежать «скольжения» фермента по ДНК в процессе неспецифического связывания и поиска мишени, и вместе с тем, обеспечивали нормальное связывание фермента, необходимое для дальнейшего каталитического акта. В результате проделанной работы Коваль В. В. удалось получить ряд принципиально новых и важных результатов. Так, были впервые получены кинетические и структурные параметры взаимодействия формамидопиримидин-ДНК гликозилазы Frg из *E. coli* с субстратами различной степени специфичности. Впервые предложен и детально охарактеризован кинетический механизм реакции,

катализируемой ферментом APE1 человека. Более того, соискателю ученой степени удалось убедительно продемонстрировать, что эффективность образования каталитически-активного комплекса фермента с субстратом напрямую зависит от способности ДНК-лиганда к изгибанию под действием фермента. Далее Коваль В. В. исследовал, как изменятся кинетические параметры при модификации активного центра фермента. В работе были полученные данные, которые впервые экспериментально четко доказали, что аспарагин в положении 212 важен именно для каталитической фазы взаимодействия APE1 с субстратом, а не для связывания и распознавания как предполагали ранее. Этот момент представляется исключительно важным и интересным. В работе на основании данных моделирования по гомологии впервые предложена 3D-структура фермента Ape1 из *Saccharomyces cerevisiae*. Установлено, что остаток гистидина в 83 положении, координирующий ионы Zn^{2+} в активном центре, играет решающую роль в каталитической стадии расщепления ДНК-субстрата.

В указанном разделе автор, Коваль Владимир Васильевич, детально анализирует полученные экспериментальные данные, сопоставляя их с литературными данными, а также обсуждает возможности и ограничения используемых методологий. Очень хорошее впечатление производит сопоставление методов и результатов предстационарного и классического стационарного анализа каталитических параметров исследуемого взаимодействия, а также поразительное совпадение т.е. «непротиворечие» данных, полученных при помощи различных методологий, что свидетельствует о высокой квалификации соискателя.

Замечания к диссертационной работе. Работа в целом производит хорошее добротное впечатление. В ней отсутствуют значимые огрехи. Сосредоточенность литературного обзора только на репарации окислительного повреждения ДНК ограничило восприятие работы. Относительно следующих глав возникают некоторые моменты, которые

следовало бы прояснить. В работе не представлены данные, касающиеся анализа чистоты используемых препаратов ферментов. Собственно, электрофоретический анализ рекомбинантных белков описан в разделе «Материалы и методы», однако анализ чистоты препаратов мутантных форм белков не приведен. Присутствие примесей может вносить дополнительный эффект, который нужно оценивать в обсуждении результатов. Поэтому мне представляется, что такие данные было бы уместно приводить в разделе «Результаты и обсуждение». Мало представлены результаты анализа чистоты и гомогенности используемых олигонуклеотидов и их модифицированных форм. Полагаю, что такие данные также было бы уместно привести в разделе «Результаты и обсуждение». Совпадение данных, полученных при помощи различных методологий позволяет исключить значимый эффект возможных примесей. Несмотря на замечания, которые следует отнести к пожеланиям, работу отличает исключительно высокий методический уровень и общая научная грамотность. Представленные в работе результаты исследования достоверны, используемые методы адекватны поставленным целям, заключение и выводы базируются на доказанных результатах.

Не обошлось в тексте без опечаток, например, нумерация глав в содержании в разделе «Материалов и методов» сбита, есть стилистические ошибки, так на рисунке 52Б (стр.154) представлена «локализация остатков активного центра».

Стоит отметить, что по результатам работы стало возможно сделать обобщение по структурно-динамическому механизму работы ферментов репарации, принадлежащих к различным семействам. Все семейства имеют сравнимое количество стадий изменения структуры белково-нуклеинового комплекса. Сравнение данных для НК-узнающих белков репарации и системы геномного редактирования CRISPR/Cas9, также взаимодействующей с ДНК и приводящей к ее расщеплению позволило оценить предложенный автором комплексный подход к анализу динамики

НК-белковых комплексов для понимания вклада ферментов в процессы узнавания НК, образования каталитически активного комплекса, расщепления НК.

На основе изучения представленной диссертационной работы можно заключить, что диссертация Коваля Владимира Васильевича «Динамическая пластичность ДНК-гликозилаз и эндонуклеаз в комплексах с ДНК: кинетические и структурные особенности», представленная на соискание ученой степени доктора химических наук по специальностям 1.4.9. Биоорганическая химия и 1.5.3. Молекулярная биология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой обосновано и содержится решение актуальных задач, имеющих весьма существенное значение для изучения свойств ферментов репарации ДНК и ферментов геномного редактирования.

Диссертационная работа Коваля Владимира Васильевича выполнена автором самостоятельно, на высоком научном и методическом уровне. Заключение и выводы, сделанные по результатам работы, обоснованы и полностью соответствуют задачам, поставленным в исследовании. Автореферат достаточно полно (несмотря на его малый объем) представляет основное содержание диссертации.

Диссертация Коваля Владимира Васильевича отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М. В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.4.9. Биоорганическая химия и 1.5.3. Молекулярная биология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Соискатель ученой степени, Коваль Владимир Васильевич, заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальностям 1.4.9. Биоорганическая химия и 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

профессор кафедры химии природных соединений химического факультета,

заместитель декана по научной работе химического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного

учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Зверева Мария Эмильевна

11 апреля 2024 г.
