

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

Изучение детального механизма, динамических и структурных аспектов действия ферментов, связывающихся с ДНК является современной актуальной задачей, решение которой способно внести существенный вклад в молекулярную биологию и структурную энзимологию. Фундаментальные данные об узнавании нуклеиновых кислот белками в супрамолекулярных комплексах могут быть использованы для выявления особенностей и закономерностей таких взаимодействий, создания новых подходов в медицине, а также использования ферментов как инструментов для изучения и коррекции ряда биологических процессов. Системы репарации геномной ДНК обеспечивают точность воспроизведения и сохранения генетической информации клетки. Проблема изучения детальных механизмов, с помощью которых клетка идентифицирует и исправляет поврежденные основания, в течение многих лет не теряет своей актуальности, поскольку репарационные процессы играют важную роль не только в жизнедеятельности здоровой клетки, но также и клетки, подвергшейся злокачественному перерождению. Речь идет об активизации ферментов репарационного каскада в раковых клетках в ответ на воздействие химиотерапевтических препаратов, что обеспечивает их повышенную выживаемость. По этим причинам глубокое понимание механизмов действия ферментов репарации необходимо для создания инструментов регулирования их активности в живой клетке.

Диссертационная работа Коваля Владимира Васильевича посвящена установлению структурно-динамического механизма узнавания ДНК-субстратов и реализации каталитической функции ферментами репарации и ферментами геномного редактирования. Поскольку информация о том, что заставляет ферменты на самых начальных стадиях каталитического цикла инициировать взаимодействие с локальными небольшими повреждениями в гетероциклах нуклеотидов, расположенных во внутренних областях двойной спирали ДНК, была неполной или отсутствовала вовсе для отдельных ферментов, получение таких знаний было актуальным. По этой причине для важнейших ферментов репарации ДНК: Fpg, hOGG1, APE1, Apr1, hNEIL2 и эндонуклеазы Cas9 молекулярное моделирование и получение структурных характеристик фермент-субстратных комплексов является актуальным. Такая информация вносит существенный вклад в структурную биологию, что, в свою очередь, расширяет наши знания о белково-нуклеиновом узнавании в надмолекулярных комплексах. Поэтому актуальность целей, сформулированных в работе Коваля В. В., не вызывает сомнений.

К началу выполнения настоящей работы не было сформировано единого мнения о молекулярно-кинетических механизмах катализируемых ДНК-гликозилазами и эндонуклеазами реакций. Кроме того, не были установлены функции отдельных аминокислот, расположенных в активных центрах ферментов, в осуществлении стадий узнавания, связывания и катализа.

Автор диссертации следующим образом формулирует основные задачи своего исследования:

1. Выявить определяющие структурные факторы и определить ключевые стадии механизма взаимодействия ДНК-гликозилаз Fpg из *E. coli* и OGG1 человека при процессинге субстратов различной степени специфичности.

2. Предложить и охарактеризовать подробные кинетические механизмы реакций, катализируемых hAPE1 и Apr1 из *S. cerevisiae* в процессе BER и в процессе инцизионной репарации нуклеотидов (NIR) при взаимодействии с ДНК-субстратами.
3. Получить и верифицировать 3D-структуры эндонуклеазы Apr1 из *S. cerevisiae* (на основе данных компьютерного моделирования) и эндонуклеазы NEIL2 человека (на основе данных по масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена и молекулярного моделирования).
4. Получить и верифицировать динамическую 3D-структуру комплекса эндонуклеазы Cas9 из *S. pyogenes* на основе масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена и данных молекулярного моделирования.

Диссертационная работа оформлена в традиционном стиле и содержит введение, обзор литературы, экспериментальную часть, описание полученных результатов, обсуждение результатов, заключение, выводы и список цитируемой литературы.

Представленный в диссертации обзор литературы посвящен структурным и кинетическим особенностям фермента hOGG1, которые имеют значение для проявления активности в процессе эксцизионной репарации оснований. Текст обзора хорошо изложен и стилистически выверен. По ходу обзора автор проводит детальное сравнение структуры и особенностей строения активного центра OGG1 человека со структурами родственных ДНК-гликозилаз из других организмов. В результате становятся понятными основные закономерности эволюции структур ферментов этого класса, в частности как приобретенные особенности позволили близким ферментам, имеющим общего предка, стать участниками различных путей репарации. Один из разделов обзора посвящен имеющимся в литературе данным о кинетическом механизме

действия hOGG1, где автор обосновывает необходимость проведения дальнейших экспериментов в нестационарных условиях.

Описание биохимических и физико-химических методов, представленное в главе «Материалы и методы» свидетельствует о большом объеме проделанной работы и тщательном подходе автора к постановке эксперимента. Следует отметить, что все этапы подготовки к кинетическим экспериментам были выполнены непосредственно самим автором, включая введение точечных замен в последовательность генов *apel* и *apn1* наработку и очистку рекомбинантных белков в бактериальных клетках.

Раздел «Результаты и их обсуждение» разделен на пять частей – по отдельной части на каждый объект исследования. В этой части работы Коваль В. В. показал, что взаимодействие ДНК-гликозилазы Fpg из *E. coli* с ДНК-субстратом, содержащими модифицированные 8-охоG нуклеотиды происходит в четыре элементарные стадии. Каждая из указанных стадий была охарактеризована структурно-динамически и кинетически. Для ДНК-гликозилазы человека OGG1 с использованием регистрации флуоресценции введенных в структуру ДНК-дуплека красителей получено распределение структур для FRET-комплекса ДНК (Cy3/Cy5) в комплексе с ферментом. В работе показано, что добавление в реакционную систему hOGG1 свободного остатка 8-BrG изменяет механизм реакции между 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой OGG1 человека и ее субстратами 8-охоG и AP-сайтами в ДНК, изменяя скорость β -элиминирования.

Для AP-эндонуклеазы человека APE1 в диссертации доказано, что аминокислотный остаток Asn212 выполняет ключевую роль в формировании нуклеофильной частицы, участвующей в процессе гидролиза фосфодиэфирной связи ДНК-субстрата. Автор показал, что скорость расщепления с помощью hAPE1 субстрата, который содержит в последовательности ДНК остаток 5,6-DHU, по пути NIR сравнима по величине со скоростью разрезания с помощью hAPE1 в процессе BER ДНК-субстрата, содержащего AP-сайт. Для функционального гомолога

hAPE1 из дрожжей – Arn1 – была впервые предложена 3D-структура фермент-субстратного комплекса.

Для ДНК-гликозилазы NEIL2 человека с использованием масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена было показано, что в свободном состоянии в растворе фермент предпочтительно находится в открытой конформации. Характерная для позвоночных область NEIL2, содержащая протяженную инсерцию в N-концевом домене и отсутствующая в других ДНК-гликозилазах, находится в неструктурированном состоянии.

Основные заключения, сделанные автором, обобщены в Выводах по работе. Главным результатом проделанной работы являются предложенные автором общие закономерности и различия в работе ряда ферментов репарации и геномного редактирования, механизмы узнавания и процессинга различных субстратов. Автор диссертации, Коваль В. В., предложил использовать комплексный методологический подход, включающий изучение кинетических характеристик взаимодействия между ферментом и субстратом, моделирование комплексов по методу молекулярной динамики и использование масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена для получения динамических структур. Полученные результаты позволяют описать процессы узнавания в белково-нуклеиновых комплексах с позиции динамической пластичности компонентов таких комплексов.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертации, изложены в 26 научных статьях и одном патенте на изобретение. Все научные работы опубликованы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов, или в перечень изданий, утвержденных списками для опубликования основных научных результатов диссертаций. Результаты работы и значимые выводы исследования также были представлены и обсуждены на ряде ведущих отечественных и международных научных конференций и конгрессов.

Как и любой объемный труд работа не лишена стилистических и пунктуационных недочетов, наличие которых не снижает общего благоприятного впечатления от работы. Главным замечанием по работе хочется отметить тот факт, что объектами исследования были шесть различных ферментов, а обзор литературы посвящен только одному из них – hOGG1. Стоило, возможно, кратко описать структурные особенности пяти оставшихся белков.

На основе изучения представленной диссертационной работы заключаю, 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 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.

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

Официальный оппонент:

научный руководитель

Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт молекулярной биологии

им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук

д.б.н., профессор, академик РАН

Макаров Александр Александрович

27 февраля 2024 г.
