

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Коваля Владимира Васильевича, представленную на соискание ученой степени доктора химических наук, 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

Репарация ДНК в силу своей неизменной актуальности остается одной из центральных проблем в биологических исследованиях. Хорошо известно, что системы репарации ДНК обеспечивают точность воспроизведения и сохранения генетической информации. Репарационные механизмы, которые использует клетка для поддержания стабильности информации, заложенной в ДНК, образуют сложную функциональную сеть, которая обеспечивает баланс между стабильностью информации в ДНК и ее эволюционной изменчивостью.

Различают эксцизионную репарацию оснований (ЭРО), эксцизионную репарацию нуклеотидов (ЭРН) и инцизионную репарацию нуклеотидов (ИРН). Многие ферменты, участвующие в репарационных процессах достаточно хорошо изучены, в т.ч. структурно охарактеризованы. К ним, в частности, относятся такие объекты диссертационного исследования как AP-эндонуклеаза 1 человека (APE1), 8-оксогуанин-ДНК гликозилазы: *E. coli* (Fpg) и человека (OGG1). С другой стороны, к началу исследования отсутствовала структурная информация по другим ферментам, изученным в данной работе, таким как эндонуклеаза Apn1 из дрожжей *S. cerevisiae* и эндонуклеаза hNEIL2.

Представленная диссертация В.В.Коваля направлена на установление структурно-динамического механизма узнавания ДНК-субстратов и реализации каталитической функции ферментами репарации

и ферментами геномного редактирования. В своей работе автор использовал комплексный подход, сочетающий кинетический анализ, методы молекулярного моделирования и масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена.

Полученные в работе данные вносят важный вклад в молекулярную и 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., и ее практическая значимость не вызывает сомнений.

Задачи, которые решались автором в ходе диссертационной работы, можно выделить в следующие три основные группы, как по набору исследуемых объектов, так и привлекаемым физико-химическим методам анализа:

1. Кинетический анализ механизма взаимодействия ДНК-гликозилаз Frg из *E. coli* и OGG1 человека с субстратами различной специфичности и выявление ключевых стадий процесса и структурных факторов, его определяющих.
2. Кинетический анализ реакций, катализируемых hAPE1 и Arn1 из *S. cerevisiae* в процессе ЭРО и в процессе ИРН при взаимодействии с ДНК-субстратами.
3. Получение и верификация 3D-структуры эндонуклеазы Arn1 из *S. cerevisiae* (на основе данных компьютерного моделирования), структур эндонуклеазы hNEIL2 человека и комплекса эндонуклеазы Cas9 из *S. pyogenes* (обе на основе данных по масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена и молекулярного моделирования).

Методологически работа базируется на использовании метода остановленной струи для исследования предстационарной кинетики ферментативных реакций, применении наборов специфических субстратов для исследования реакций, протекающих в стационарных условиях,

современных подходов к моделированию белковых структур, а также использованию масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена для исследования динамических свойств биомакромолекул.

Диссертационная работа написана в традиционном стиле и содержит введение, обзор литературы, экспериментальную часть, описание полученных результатов, обсуждение результатов, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 253 страницах, содержит 75 рисунков, 7 схем и 16 таблиц. Библиография включает 297 литературных источников.

Несомненным украшением работы является литературный обзор, посвященный структурным особенностям взаимодействия hOGG1 с ДНК-субстратами. Остается только сожалеть, что он включает лишь один единственный объект исследования данной диссертационной работы и абсолютно не затрагивает другие многочисленные объекты исследования.

Раздел «Материалы и методы» в целом отражает экспериментальную часть диссертации, однако содержит и существенные упущения, о которых отдельно сказано ниже в разделе «Замечания по диссертационной работе».

«Результаты и их обсуждение» состоят из пяти частей по числу объектов исследования диссертационной работы. Используя несколько десятков олигонуклеотидов (ОДН), содержащих различные вставки модифицированных нуклеозидов, В.В.Коваль спланировал и осуществил ряд экспериментов по связыванию и действию ферментов репарации: Fpg, hOGG1, APE1, Apr1, hNEIL2 и эндонуклеазы Cas9 на сконструированные субстраты, используя разнообразные методические подходы. В частности, им было выполнено: титрование ферментов в стационарных условиях соответствующими ДНК; ферментативное разрезание [³²P]-меченых субстратов и анализ скорости накопления продуктов; регистрация изменений интенсивности флуоресценции 2-аминопурина, введённого в

ДНК-субстраты; изменение интенсивности флуоресценции остатков триптофана белков; наконец – использование водородно-дейтериевого обмена с масс-спектрометрической регистрацией.

Одним из интересных результатов является предложение кинетической схемы ферментативного процесса, описывающая механизм превращения субстратов ферментами hAPE1 и Apn1 из *S. cerevisiae* в процессах ИРН и ЭРО. По предположению автора, наблюдаемые в настоящей работе изменения конформации указанных ферментов после образования начального фермент-субстратного комплекса приводят к изгибанию ДНК и выворачиванию AP-сайта или модифицированного остатка из спирали. При этом образуются каталитически активные фермент-субстратные комплексы, в которых происходит гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи субстратов. В то же время в работе показано, что после образования комплекса с неповреждённой ДНК AP-эндонуклеазы также меняют свою конформацию. Автор полагает, что, двигаясь по ДНК, APE1 и Apn1 меняет свою конформацию, непрерывно пытаясь образовать каталитически активный комплекс. Такой комплекс ферменту удаётся образовать лишь при взаимодействии с сайтами ДНК, которые содержат повреждения, являющиеся субстратами для AP-эндонуклеаз. Таким образом, механизм образования комплекса APE1 и Apn1 с ДНК-субстратом, вероятно, представляет собой комбинацию моделей «конформационной селекции» и «индуцированного соответствия». Активные центры ферментов достаточно пластичны для этого. Полученные в работе данные указывают на то, что комплексы APE1 и Apn1 с продуктами разрезания субстратов стабильны. Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют предположить, что структуры ферментов hAPE1 и Apn1 также оптимизированы для того, чтобы удерживать расщеплённую ДНК.

Основным достижением диссертационной работы являются выявленные автором общие закономерности и различия в работе ряда ферментов репарации и геномного редактирования, механизмы узнавания и процессинга различных субстратов. Полученные результаты позволяют описать процессы узнавания в белково-нуклеиновых комплексах с позиции динамической пластичности компонентов таких комплексов.

Замечания по диссертационной работе.

В тексте диссертации достаточно много опечаток и неточностей, например: стр.58, 59, 66, 93 (неверный код PDB), 129 (неправильный номер рисунка) и пр. Особенно впечатляют «пОрочные взаимодействия» на стр.59 и «кристаллизация Asp268» на стр.61.

Ни диссертация, ни автореферат не являются легким чтением. К сожалению, отсутствие литературного обзора по большей части исследуемых объектов не украшает данную работу и зачастую затрудняет ее понимание.

Слишком лапидарно написана экспериментальная часть. Хотелось бы более подробное изложение, особенно в части обработки результатов экспериментов. При переработке диссертации полностью выпал ранее существовавший раздел «Количественная обработка данных предстационарной кинетики». Экспериментальные кинетические кривые захватывают протяженный временной диапазон от миллисекунд до минут и остается загадкой как эти данные были получены и обработаны.

С учетом сложности рассматриваемых механизмов (пять и более индивидуальных стадий), значительного объема информации, извлекаемой после обработки кинетических экспериментов (до четырех значений констант скоростей прямой и обратной реакции), хотелось бы видеть более строгую статистическую обработку данных. В частности, можно было бы показать, что действительно набор вычисляемых констант является не избыточным, а наоборот, минимально необходимым для описания

экспериментальных кривых, тем более что автор оценивает общую ошибку в определении кинетических параметров в 20 %.

Остается загадкой почему автор в одном случае выделяет различные фазы на кинетических кривых (раздел 3.2.1, рис.48), что существенно облегчает чтение и понимание, а в других случаях – нет (например, раздел 3.1).

Следует отметить определенную эклектичность диссертационной работы. Впечатляющий набор методов исследования, широкая палитра изученных ферментов, к сожалению, не складываются в одну когерентную картину. Наверное, более объемное Заключение могло бы исправить данное впечатление тем более, что в нем были сделаны определенные интересные обобщения (предпоследний абзац), которые, к сожалению, не получили своего развития.

Сделанные замечания в целом не мешают высоко оценить выполненную работу, результаты которой отражены в многочисленных публикациях в известных международных журналах. Результаты работы и предложенные по ним выводы исследования также были представлены и обсуждены на ряде ведущих отечественных и международных научных конференций, и конгрессов.

На основе изучения представленной диссертационной работы можно сделать вывод, 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 представлено обоснование и содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для исследования структурно-динамических

свойств ферментов репарации ДНК и ферментов геномного редактирования.

Диссертационная работа Коваля Владимира Васильевича выполнена автором самостоятельно, на высоком научном и методическом уровне. Заключение, обобщения и выводы, сделанные по результатам работы, обоснованы и полностью соответствуют задачам, поставленным в исследовании. Автореферат верно отражает основное содержание диссертации.

Диссертация Коваля Владимира Васильевича отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М. В. Ломоносова к подобного рода работам. 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.

Диссертационная работа Коваля В. В. 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 учреждения

«Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук»

доктор химических наук, профессор, академик РАН

Попов Владимир Олегович

12 апреля 2024 г.
