

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Яковлева Даниила Алексеевича «Конформационная динамика урацил-ДНК-гликозилаз человека SMUG1 и MBD4 в процессе взаимодействия с ДНК»**

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Диссертационная работа Яковлева Д. А. посвящена анализу процесса узнавания ДНК-субстратов двумя белками системы эксцизионной репарации оснований ДНК человека — специфичной к одноцепочечной ДНК монофункциональной урацил-ДНК-гликозилазой 1 (SMUG1) и белком 4, содержащим метил-СрG-связывающий домен (MBD4).

Как SMUG1, так и MBD4 относятся к ферментам, способным удалять из ДНК основания урацила — продукта спонтанного дезаминирования цитозина, в норме существующего лишь в РНК, но не в ДНК. Интересно, что, несмотря на общую субстратную специфичность, эти белки не гомологичны и не близки по своей третичной структуре. Кроме того, каждый из них обладает функциональными особенностями, роль которых до сих пор не прояснена: SMUG1 характеризуется крайне высоким сродством к ДНК-продукту и низким числом оборотов, а MBD4 содержит метил-СрG-связывающий домен, который предположительно должен направлять активность этого фермента в СрG-богатые области генома. Оба эти белка играют заметную роль в защите генома от мутаций и изучаются во многих лабораториях, занимающихся репарацией ДНК. Таким образом, работа Яковлева Д. А. вписывается в контекст мировых исследований, и ее актуальность не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Яковлева Д. А. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 181 наименование.

Обзор литературы дает краткую информацию о пути эксцизионной репарации оснований ДНК в целом и о механизме катализа ферментами, относящимися к классу ДНК-гликозилаз. Также кратко освещены механизм поиска повреждений ДНК-гликозилазами в длинных линейных молекулах ДНК и общие принципы анализа реакций методом остановленного потока с флуоресцентной детекцией. Более подробно обсуждены структуры урацил-ДНК-гликозилаз человека — как исследованных в работе SMUG1 и MBD4, так и белков UNG2 и TDG, которые гомологичны SMUG1. В целом литературный обзор отвечает поставленным задачам, однако местами чрезвычайно краток. Так, описанию механизмов поиска поврежденного нуклеотида ДНК-гликозилазами посвящено всего две страницы, в то время как по этому вопросу существует обширная литература, создано более десятка кинетических моделей и разработаны экспериментальные подходы как на уровне отдельных

молекул, так и на уровне молекулярных ансамблей. Поскольку в дальнейшем автор затрагивает вопросы поиска повреждения ферментом MBD4, эту сторону механизма действия ДНК-гликозилаз явно стоило бы рассмотреть подробнее. То же самое можно сказать о части, посвященной методу остановленного потока, где явно не хватает объяснений, как из экспериментальных данных выводятся кинетические механизмы реакции. Эта информация частично дана в разделе «Материалы и методы», однако гораздо уместнее смотрелась бы в литературном обзоре.

Глава «Материалы и методы» содержит описание современных биохимических и вычислительных методов, использованных в работе. Методы исследования описаны с достаточной степенью детализации, за исключением части, посвященной моделированию структур белков. В ней в принципе отсутствуют какие-либо детали о гомологичном моделировании, а для молекулярной динамики не указаны метод первоначальной минимизации, продолжительность шага интегрирования и позиционные ограничения, накладывавшиеся на отдельные атомы (в неявном растворителе они, очевидно, были). В целом лучше было бы оформить эту часть отдельным подразделом, а не объединять с кинетическим анализом. Кроме того, в главе «Материалы и методы» стоило бы привести данные о чистоте препаратов белков, использованных в экспериментах.

Раздел диссертационной работы «Результаты и обсуждение» разделен на 8 частей, из которых первые 4 посвящены белку SMUG1, а оставшиеся — белку MBD4. Для SMUG1 построена и проанализирована модель пространственной структуры, и на ее основании выбраны 3 аминокислотных остатка для сайт-направленного мутагенеза. Изучена общая активность фермента SMUG1 дикого типа и мутантных вариантов F98W, H239A и R243A, и показано, что первые две замены приводят к снижению активности, а третья, наоборот, ее увеличивает. Далее методом остановленного потока с детекцией флуоресценции остатков триптофана в белке, репортерного основания 2-аминопурина в ДНК и флуоресцентно-резонансной пары на концах ДНК исследовано взаимодействие SMUG1 и его вариантов с ДНК-субстратом и ДНК-продуктом, и установлен кинетический механизм полного цикла реакции, включающий две стадии узнавания субстрата, каталитическую стадию и высвобождение продукта. Аналогичная серия экспериментов выполнена для каталитического домена белка MBD4, за исключением того, что в этом случае исследовался лишь белок дикого типа, а субстратные ДНК имели разную длину для анализа процесса первичного поиска повреждения. Интересно, что общий кинетический механизм MBD4 оказался тем же, что и для SMUG1.

В ходе работы соискателем методом остановленного потока с флуоресцентной детекцией установлены кинетические механизмы реакций удаления урацила из ДНК



ферментами SMUG1 и MBD4 человека и обоснована их идентичность, несмотря на совершенно разные структуры исследованных белков. Показано, что в ходе реакции предкаталитический комплекс образуется в ходе нескольких стадий взаимной конформационной подгонки молекул фермента и ДНК-субстрата. Показано влияние аминокислотных замен F98W, H239A и R243A на активность фермента SMUG1 и предложены объяснения этого влияния на основании структуры белка. Установлено, что скорость поиска повреждения ферментом MBD4, в отличие от последующих шагов узнавания и катализа, зависит от длины ДНК-субстрата. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, во всех случаях представляется вполне аргументированной.

К работе можно сделать ряд замечаний. Молекулярно-динамическое моделирование длиной 5–10 нс даже в неявном растворителе очевидно недостаточно для характеристики системы — сейчас адекватными временами для белков сходного размера считаются сотни наносекунд в неявном и тысячи — в явно заданном растворителе. Результаты моделирования, представленные в работе, могут лишь дать представление о локальном поведении отдельных боковых радикалов в активном центре фермента, но даже говорить о стабильности водородных связей на основании этих данных невозможно. При представлении результатов кинетики, определенной методом остановленного потока, необходимо приводить графики отклонения экспериментальных данных от расчетных кривых (residuals) и крайне желательно приводить данные о значениях и погрешности коэффициентов флуоресценции отдельных компонентов реакционной смеси (responses), которые наряду с константами скоростей стадий реакции входят в число аппроксимируемых параметров. Для наглядности сопоставления стадий реакции, установленных с использованием разных флуоресцентных репортеров, стоило бы привести графики накопления и расхода интермедиатов реакции, которые легко строятся на основе полученных значений констант. Наконец, хотелось бы видеть более детальный анализ влияния длины ДНК-субстрата на начальные стадии связывания с ним белка MBD4 с использованием любой из хорошо проработанных моделей случайного блуждания на одномерной решетке, что позволило бы исследовать процесс поиска повреждений этим ферментом.

Сделанные замечания не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Работа Яковлева Д. А. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованных автором работ по данной теме.

Работа Яковлева Д. А. является завершенной в целом научно-квалификационной работой, в которой решена задача установления кинетических механизмов конформационных переходов в молекулах фермента и ДНК в процессах, катализируемых ферментами SMUG1 и

MBD4, имеющая существенное значение для важнейшего направления биохимии — выявления общих закономерностей узнавания белками конформационно сложных субстратов.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание ученой степени кандидата наук, а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации Яковлев Данила Алексеевич, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Заведующий лабораторией белковой инженерии  
Федерального государственного автономного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет», доктор биологических  
наук, доцент, профессор РАН, член-корреспондент РАН

Жарков Дмитрий Олегович

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ)**

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Телефон: (383) 363-40-00

Факс: (383) 363-42-80

Эл. адрес: rector@nsu.ru

Подпись Жаркова Дмитрия Олеговича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного  
автономного образовательного учреждения высшего  
образования «Новосибирский национальный  
исследовательский государственный университет», к. х. н.

Тарабан Е. А.



7 июня 2021 г.