

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Яковлева Данилы Алексеевича «Конформационная динамика урацил-ДНК-гликозилаз человека SMUG1 и MBD4 в процессе взаимодействия с ДНК»**, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

**АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.** Диссертационная работа Яковлева Д.А. посвящена исследованию механизма действия высокоспецифичных ферментов из системы эксцизионной репарации оснований (BER) человека – урацил-ДНК-гликозилаз (УДГ) – SMUG1 и MBD4. Известно, что даже если наши гены повреждены, не все еще потеряно. ДНК – единственная клеточная макромолекула, способная исправлять повреждения в собственной структуре. В ней закодирована информация о механизмах тех процессов, которые занимают репарацией. Ежедневно у человека возникает около 50 тыс. одноцепочечных разрывов, более 8 тыс. окисленных и алкилированных оснований, около 100 сложных повреждений (двухцепочечные разрывы, межмолекулярные ковалентные сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок). Благодаря наличию в клетке систем репарации из 1000 повреждений ДНК различного типа лишь одно приводит к мутации. Среди систем репарации наиболее прецизионной является система BER. Это связано с тем, что ключевой белок этой системы – ДНК-гликозилаза, узнает строго определенные поврежденные гетероциклические основания и удаляет их из ДНК путем гидролиза N-гликозидной связи. В клетках человека экспрессируется 11 ДНК-гликозилаз, принадлежащих к четырем разным структурным суперсемействам.

Одним из наиболее распространенных нарушений структуры в ДНК является появление в ее последовательности остатков дезоксиуридина (dU) в результате дезаминирования цитидина или в процессе репликации. Четыре из 11 ДНК-гликозилаз способны узнавать и удалять урацил. Две из них являются объектом диссертационной работы Яковлева Д.А. Механизм функционирования фермента SMUG1 человека мало изучен. Вместе с тем, биологическая роль этого белка значительно шире, чем удаление остатков урацила. Так, основные функции SMUG1 мыши заключаются в удалении 5-гидроксиметилурацила и подстраховке работы основной УДГ – UNG2. Нокаут гена *SMUG1* приводит к значительному укорочению теломер в клетках человека.

Вторым объектом исследования является метил-СрG-связывающий фермент 4 (MBD4) человека. Он играет важную роль в активном деметилировании ДНК, эпигенетической регуляции экспрессии генов и апоптозе. В данной работе изучается каталитический домен этого фермента. Решены структуры комплексов MBD4<sup>cat</sup> с различными модифицированными ДНК. Однако вопрос об особенностях катализа удаления поврежденных оснований из ДНК этим ферментом остается открытым. Исходя из вышеизложенного исследования Яковлева Д.А., направленные на изучение механизмов конформационных превращений в комплексах SMUG1

и MBD4<sup>cat</sup> человека с ДНК-субстратами и ДНК-лигандами – аналогами продуктов реакции, являются актуальными.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.** Безусловно данные рентгеноструктурного анализа позволяют лучше всего понять основные взаимодействия белка и ДНК-лиганда в наиболее стабильной конформации. Однако они не позволяют установить кинетические механизмы конформационных переходов, которые имеют место в процессе функционирования ферментов, оперирующих на ДНК. Для ликвидации этих пробелов в случае белков SMUG1 и MBD4 Яковлев Д.А. использовал метод «остановленного потока», позволяющий следить за конформационной динамикой ДНК-белковых взаимодействий, протекающих в течение нескольких секунд. В результате работы выявлены три ключевых аминокислотных остатка SMUG1 и высказано предположение о их роли в узнавании и удалении dU. В случае MBD4 показано, что увеличение длины субстрата влияет на скорость поиска повреждения и не затрагивает другие процессы. В целом, для обеих ДНК-гликозилаз, принадлежащих к разным структурным семействам, предложен кинетический механизм конформационных переходов. Практическая значимость работы заключается в том, что Яковлев Д.А. показал возможность применения метода Монте Карло для анализа данных и установления механизма конформационных переходов. Такой подход позволил автоматически генерировать большое количество действительно случайных входных параметров для системы дифференциальных уравнений в методе нелинейной регрессии при определении констант скорости стадий кинетического механизма. Преимуществами предложенного подхода также являются возможность автоматически находить устойчивые решения системы, лучшая оценка погрешности аппроксимации из-за увеличения количества наблюдений и отсутствие субъективных искажений при «ручном» поиске наиболее правдоподобного локального минимума.

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.** Анализ структуры диссертационной работы Яковлева Д.А. «Конформационная динамика урацил-ДНК-гликозилаз человека SMUG1 и MBD4 в процессе взаимодействия с ДНК» свидетельствует о том, что она написана в соответствии с традиционным планом и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, а также содержит обобщающее заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 181 источник. Работа изложена на 114 страницах печатного текста и проиллюстрирована 11 таблицами, 64 рисунками и 9 схемами.

Раздел «Введение» раскрывает актуальность выбранной темы, включает формулировку целей и задач исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, информацию о личном вкладе автора в

представленную работу. В нем сформулирован нерешенный до данного исследования вопрос, касающийся конформационных превращений в процессе взаимодействия ферментов MBD4 и SMUG1 с dU-содержащей ДНК.

Глава 1, обзор литературы, посвящен особенностям структуры и субстратной специфичности урацил-ДНК-гликозилаз. В нем кратко рассматриваются базовые вещи, например, BER, пути возникновения урацила в ДНК. Кроме того, в обзоре обсуждаются механизмы каталитической активности гликозилаз, их пространственная структура, использование метода «остановленного потока» для их изучения. Также приводятся известные на сегодняшний день данные, накопленные для 4 ДНК-гликозилаз человека, обладающих специфичностью по отношению к dU, в том числе для объектов данной работы SMUG1 и MBD4. Обзор литературы логически подводит читателя к Главе 3 «Результаты и их обсуждение» и позволяет лучше понять и оценить приведенные в ней данные.

В Главе 2 «Материалы и методы» приведена информация о используемых ДНК-субстратах и лигандах, представлены методики выделения ферментов, исследования накопления продукта их функционирования, а также конформационной динамики взаимодействия SMUG1 и MBD4<sup>cat</sup> с ДНК. Подробно, в доступной форме дан пошаговый анализ полученных методом «остановленного потока» кинетических кривых и установления числа стадий кинетического процесса. Отдельного внимания заслуживает моделирование Яковлевым Д.А. структуры комплексов с SMUG1 и MBD4 с dU-содержащей ДНК. В частности, кристаллическая структура SMUG1 человека до сих пор не получена, тем более неизвестна структура комплексов этого фермента с ДНК. Моделирование комплекса SMUG1 с ДНК-субстратом оказалось нетривиальной задачей – в PDB нет подходящих структур-шаблонов для ферментов того же структурного семейства, а подходы, используемые для моделирования комплексов из первых принципов, либо оптимизированы для малых молекул, либо требуют больших вычислительных мощностей. Диссертант предложил и реализовал свой подход к решению этой проблемы, что потребовало от него освоения новых программ и биоинформатических сервисов.

В главе 3 «Результаты и их обсуждение» можно выделить две смысловые части, связанные с двумя объектами исследования – урацил-ДНК-гликозилазами SMUG1 и MBD4<sup>cat</sup>. В каждой из частей решена задача по установлению кинетического механизма узнавания dU этими ферментами и их взаимодействию с ДНК – аналогом продукта реакции. Экспериментальной работе предшествовало создание структурных моделей комплексов ферментов с ДНК, что, несомненно, было необходимо для интерпретации экспериментальных данных. Собственно экспериментальная работа состояла из двух типов экспериментов: изучения удаления урацила из модельных ДНК методом электрофореза в полиакриламидном геле и исследование быстрой кинетики методом «остановленного потока». В последнем случае следили за изменением

флуоресценции реакционной смеси. Замечательно, что в этом исследовании наблюдали как за конформационными переходами белков (по изменению флуоресценции Trp), так и за изменением конформации ДНК (использовали ДНК с аминоксипурином или FRET-парой). Кроме того, в работе использовали мутантные формы SMUG1 и различные ДНК-лиганды. В результате работы Яковлев Д.А. впервые показал, что для SMUG1 и MBD4<sup>cat</sup> человека характерен минимум четырехстадийный механизм взаимодействия с субстратом, и он одинаков, несмотря на то, что изучаемые белки относятся к разным структурным семействам. На начальной стадии протекает неспецифическое связывание фермента с ДНК и поиск повреждения, затем происходит образование каталитически-компетентного фермент-субстратного комплекса, сопровождающееся выворачиванием поврежденного основания в карман активного центра фермента и встраиванием аминокислотных остатков ферментов в образованную полость в ДНК. В каталитическом комплексе происходит гидролиз N-гликозидной связи с последующей диссоциацией комплекса фермент-продукт. Анализ полученных автором структурных моделей белково-нуклеиновых комплексов и экспериментальных данных позволил диссертанту впервые установить, что Phe98 фермента SMUG1 может фиксировать элиминируемое основание в активном центре фермента за счет межплоскостных взаимодействий, His239 необходим для взаимодействия с углеводофосфатным остовом ДНК и катализа, Arg243 входит в интеркалирующую в ДНК петлю белка также, фиксируя выведенное из состава двойной спирали «ошибочное» основание.

Работу завершает раздел «Заключение», обобщающий все полученные данные. Выводы объективно отражают суть представленных исследований и соответствуют поставленным экспериментальным задачам.

Следует отметить, что работа написана грамотно, хорошим литературным языком, прекрасно иллюстрирована. Глава 3 «Результаты и их обсуждение» представлена четко, но достаточно кратко. Это с одной стороны является достоинством работы, с другой стороны возникает необходимость в некоторых пояснениях.

### **ЗАМЕЧАНИЯ**

1. На мой взгляд в работе не хватает сравнения установленных Яковлевым Д.А. кинетических механизмов функционирования SMUG1 и MBD4<sup>cat</sup> человека с предложенными ранее кинетическими механизмами для урацил-ДНК-гликозилазы UNG2 человека и УДГ *E. coli*. Учитывая наличие общих принципов работы системы BER для монофункциональных ДНК-гликозилаз, представляется важным сравнение кинетических механизмов взаимодействия с поврежденной ДНК для ДНК-гликозилаз с различной субстратной специфичностью.

2. В Главе 2 «Материалы и методы» не указано, с помощью каких программ и биоинформатических сервисов моделировали комплекс MBD4<sup>cat</sup> с 17-звенным dU-содержащим субстратом, использованным в работе.

3. К Главе 3 «Результаты и их обсуждение» имеется целый пул вопросов, связанных с экспериментальным исследованием мутантных форм белка SMUG1 человека.

- Из работы не понятно, почему не изучали методом «остановленного потока» взаимодействие мутантных форм SMUG1 с аминокислотными заменами Phe98 и His239 с ДНК-лигандом - аналогом продукта.

- Для этих мутантных форм было проанализировано накопление продукта реакции методом гель-электрофореза и установлено, что они имеют низкую активность. Следовало посмотреть их комплексообразование с ДНК одним из стандартных методов («торможение в геле», конкурентное вытеснение). Иначе неочевидно, сделанное автором заключение, о том, что His239 важен для узнавания повреждения в ДНК.

- В диссертации нет упоминания об исследовании взаимодействия мутантной формы SMUG1 с заменой Phe98 на триптофан с ДНК методом «остановленного потока», однако на стр. 89 этот белок фигурирует среди остальных как объект для, которого были изучены конформационные переходы.

- Есть затруднения с пониманием интерпретации данных, полученных для мутантной формы SMUG1(R243A). На стр. 79 сказано, что характер конформационных изменений комплекса этого белка с аналогом ДНК с аминопурином аналогичен изменениям, наблюдаемым при взаимодействии указанного лиганда с ферментом дикого типа. На стр. 81 написано, что аминокислотная замена R243A не влияет на характер регистрируемых изменений интенсивности флуоресценции при использовании ДНК-лиганда с FRET-парой. При этом предлагаются разные кинетические схемы описываемых процессов для обоих белков: в случае мутантного белка – схема 3 (для ДНК с аминопурином) и схема 1 (для ДНК с FRET-парой), а для дикого типа SMUG1 - в точности наоборот.

4. В разделе 3.7. Главы 3 «Результаты и их обсуждение» сравнивается конформационная динамика взаимодействия MBD4<sup>cat</sup> с ДНК-субстратами разной длины – 12-, 17- и 28-звенным. Может ли на 12-звенном субстрате осуществляться линейная диффузия? Какое место посадки этого фермента на ДНК? Если линейная диффузия возможна, то нельзя ли было из полученных данных рассчитать ее тип, как это анонсируется в обзоре литературы – стр. 14-15.

Высказанные замечания не снижают общий высокий уровень представленной работы и в большой степени свидетельствуют о сложности выбранных объектов изучения. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в международных и российских научных рецензируемых журналах.

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Министерства образования Российской Федерации и полностью отражает основные положения диссертации.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Все вышеизложенное позволяет констатировать, что диссертация Яковлева Д. А. «Конформационная динамика урацил-ДНК-гликозилаз человека SMUG1 и MBD4 в процессе взаимодействия с ДНК», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, является законченным самостоятельным научным исследованием, в котором автором решен ряд важнейших задач в рамках динамично развивающегося практически значимого научного направления, связанного с исследованием ферментов репарации ДНК. По актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация соответствует критериям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата химических наук, и соответствует специальности 1.5.4 – биохимия. 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, заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот  
Научно-исследовательского института физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения высшего  
образования «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова»,  
доктор химических наук, профессор

Кубарева Елена Александровна

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40  
Телефон: +7(495)939-54-11  
Электронная почта: [kubareva@belozersky.msu.ru](mailto:kubareva@belozersky.msu.ru)

Подпись Кубаревой Е.А. удостоверяю.

Директор Научно-исследовательского института физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения высшего  
образования «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова»,  
академик РАН



В.П. Скулачев

«10» июня 2021 г.