

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 биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Репарация ДНК остается одной из центральных проблем в биологических исследованиях, развитие которых ставит все новые и новые вопросы. Как известно, системы репарации ДНК обеспечивают точность воспроизведения и сохранения генетической информации. Репаративные механизмы, которые использует клетка для поддержания стабильности информации, заложенной в ДНК, образуют сложную сеть, сплетенную функциональными связями между структурными элементами, которая обеспечивает баланс между стабильностью информации в ДНК и ее эволюционной изменчивостью. Известно, что нарушение механизмов репарации ДНК в целом приводит к различным патологическим процессам, в число которых входят канцерогенез, дефекты развития и старение.

Диссертационная работа Яковлева Данилы Алексеевича посвящена актуальной проблеме исследования особенностей конформационной динамики фермент-субстратных комплексов в процессе образования каталитически-компетентного состояния на примере двух урацил-ДНК-гликозилаз человека, участвующих в системе эксцизионной репарации оснований ДНК. Обе указанные ДНК-гликозилазы осуществляют гидролиз *N*-гликозидной связи в цепи ДНК и обладают субстратной специфичностью преимущественно к основаниям урацила, хотя и принадлежат к разным структурным семействам. До сих пор непонятно, каким образом ДНК-гликозилазы осуществляют дискриминацию субстратных и несубстратных азотистых оснований. Ясно, что связывание субстратного основания в активном центре фермента должно предваряться его селекцией среди других оснований, которые в принципе могут, но не должны служить субстратами. Изучение механизмов такой селекции субстратов на сегодняшний день чрезвычайно актуально не только для углубления знаний собственно о репарации ДНК, но и для понимания механизма действия ферментов вообще и создания белковых катализаторов с заданными свойствами.

Автор диссертации следующим образом формулирует задачи своего исследования:

- Изучить конформационную динамику ферментов MBD4 и SMUG1 (дикого типа и мутантных форм F98W, H239A и R243A) и ДНК в процессе их взаимодействия методом «остановленного по-тока» с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции остатков триптофана в белке, а также флуоресцентных и FRET-меток, введенных в ДНК.

- С помощью методов моделирования по гомологии и молекулярной динамики получить структуры комплексов SMUG1 дикого типа и мутантных форм (F98W, H239A, R243A), с ДНК и установить роль данных аминокислотных остатков в процессах специфического узнавания повреждения и катализа.

- Используя последовательное усложнение ДНК-субстратов и увеличение их длины изучить влияние длины ДНК-дуплекса на кинетику связывания MBD4 с ДНК и удаления повреждения.

• На основании совокупности теоретических и экспериментальных данных предложить кинетический механизм конформационных превращений в процессе взаимодействия ферментов MBD4 и SMUG1 с поврежденной ДНК.

В работе Яковлева Д.А. впервые описаны структурно-кинетические механизмы взаимодействия ферментов человека SMUG1 и MBD4 с ДНК. Было показано, что и ферменты, и ДНК претерпевают согласованные последовательные конформационные изменения в процессе узнавания поврежденного нуклеотида и катализа.

Для детального сравнения механизмов узнавания поврежденного нуклеотида методами гомологичного моделирования и молекулярной динамики получили структурные модели комплексов данных ферментов с поврежденной ДНК. Быстрые изменения конформации ферментов и субстратов наблюдали методом «остановленного потока» с регистрацией уровня флуоресценции реакционной смеси.

Для обоих ферментов установлен кинетический механизм конформационных переходов, состоящий, как минимум из четырех стадий. 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. Несмотря на то, что ферменты SMUG1 и MBD4 относятся к разным структурным семействам, они имеют пересекающуюся субстратную специфичность и претерпевают схожие конформационные превращения при взаимодействии с ДНК.

Структурные модели SMUG1 дикого типа и мутантных форм позволяют определить ряд потенциально важных аминокислотных остатков активного центра. Показано, что остаток Phe98 фиксирует вывернутое основание в активном центре за счет стекинг-взаимодействия, His239 необходим для связывания фермента с сахарофосфатным остовом ДНК и катализа, а остаток Arg243 встраивается в образующуюся в ходе взаимодействия полость в ДНК и также фиксирует вывернутое состояние поврежденного нуклеотида, образуя водородные связи с комплементарным поврежденному основанию. Важность этих аминокислотных остатков показана экспериментально: замены аминокислот Phe98 и His239 приводят практически к полной инактивации фермента, в то время как замена Arg243 на Ala приводила к небольшому увеличению скорости удаления урацила из ДНК. При этом методом КД показано, что ни одна из описанных аминокислотных замен не приводит к значительному изменению укладки фермента.

Показано, что замена Arg243 на Ala расширяет субстратную специфичность фермента за счет снижения чувствительности именно к U:G парам. Сравнение кинетических параметров отдельных стадий, в том числе, рассчитанных значений k_{cat} и K_M , показывает, что более высокая каталитическая активность мутантной формы R243A по сравнению ферментом дикого типа, преимущественно, связана со значительно низкой эффективностью комплексообразования фермента с продуктом *N*-гликозилазной реакции. Полученные данные согласуются с аналогичными для большинства других ДНК-гликозилаз и показывают общую логику их работы: связывание – фиксация повреждения – катализ – диссоциация.

Исследование кинетики взаимодействия MBD4 с субстратами разной длины показало, что увеличение длины субстрата влияет только на скорость стадии поиска

повреждения и не затрагивает остальные стадии процесса. В случае коротких (12 п. н.) субстратов сильны эффекты частичного расплавления концов дуплекса, которые замедляют связывание фермента с ДНК. В случае длинных субстратов (28 п. н.) становится значимым вклад одномерного скольжения фермента вдоль ДНК в кинетику связывания. В ряду субстратов с длиной 12 – 17 – 28 п. н. поиск повреждения происходит с наибольшей скоростью в случае 17-звенного субстрата. Среди урацил-ДНК-гликозилаз процесс перемещения фермента по ДНК хорошо изучен только для фермента UNG2 и его ортолога Udg *E. coli*, полученные данные позволяют сравнить динамику перемещения этих ферментов по ДНК с MBD4 и вносят вклад в описание процесса перемещения белков по ДНК в целом.

По содержанию и оформлению диссертации принципиальных замечаний нет. Есть незначительные замечания по представлению подписей к рисункам в автореферате (Рис. 6, 8, 11, 12), где сам рисунок на одной странице, а подпись на другой. Надо отдать должное, что в диссертации этих недостатков нет. В ходе изучения этой прекрасной работы возник один комплексный вопрос, существуют ли природные мутации в ферментах SMUG1 и MBD4с, если да, то есть ли физиологическая значимость таких мутаций, насколько они соотносятся с выбранными автором для изучения, и можно ли сделать предположения о кинетических причинах влияния таких мутаций.

Сделанные замечания не портят очень хорошего впечатления от работы, выполненной на высоком уровне и посвященной весьма актуальной проблеме химической биологии и фундаментальной медицины – действию ферментов репарации ДНК. Представленная работа является комплексным кинетическим и молекулярно-динамическим исследованием механизмов действия урацил-ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 человека. Полученные данные позволили установить кинетические схемы ферментативных процессов; рассчитать константы скорости и константы равновесия всех стадий, входящих в эти схемы; определить молекулярную природу отдельных стадий взаимодействия ферментов SMUG1 и MBD4с ДНК-субстратами; установить стадии, которые вносят наибольший вклад в специфичность узнавания ферментами ДНК-субстратов и уточнит роль аминокислотных остатков активного центра.

Проведенное исследование позволяет глубже понять механизмы удаления окислительных повреждений из ДНК и установить роль конформационных превращений ферментов репарации и ДНК в протекании этих процессов.

Установление практики предстанционарных измерений в разряд обычных лабораторных процедур, возможность которых показывает работа Д.А. Яковлева, полезно и перспективно для широкого круга молекулярно-биологических и биотехнологических исследований, ведущихся в институтах РАН и других научных учреждений. Знакомство с работой и изучение ее практических результатов можно рекомендовать в самом широком масштабе, включая институты РАН и ведомственные научные учреждения.

Диссертационная работа Д.А. Яковлева является новой самостоятельной работой, выполненной на актуальную тему. По своей научной новизне, практической ценности и завершенности диссертация Д.А. Яковлева «Конформационная динамика урацил-ДНК-гликозилаз человека SMUG1 и MBD4 в процессе взаимодействия с ДНК» соответствует 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 наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Заместитель директора по научной работе
Главный научный сотрудник
Отдела пептидно-белковых технологий
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

д.х.н.

Смирнов Иван Витальевич

117997, Россия, г. Москва,
Ул Миклухо-Маклая, 16/10
Тел. (495) 727-38-60
E-mail: smirnov@mx.ibch.ru

Подпись д.х.н. Смирнова И.В.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИБХ РАН
доктор физ.-мат.наук

Олейников В.А.



«18» июня 2021 года