



ФАНО РОССИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
**ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ**  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

123182 Москва, пл. Акад. Курчатова, д. 2  
Тел. (499)196-0000, Факс (499)196-0221, [www.img.ras.ru](http://www.img.ras.ru), E-mail: [img@img.ras.ru](mailto:img@img.ras.ru)  
ИНН/КПП 7734021670/773401001, ОКПО 04683332, ОГРН 1027739480955

02.04.18 № 12317/185  
На № 15309-д7/182/1 от 20.02.18.

[ ]

[ УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Институт  
молекулярной генетики Российской академии  
наук  
Член корреспондент РАН, д.б.н.



Костров С.В.

« 02 » апреля 2018 г.]

### ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН) на диссертационную работу **Алемасовой Елизаветы Эдуардовны** «Мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1: исследование его роли в репарации ДНК», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

#### Актуальность темы диссертационной работы

Системы репарации ДНК, ввиду своей исключительной важности для функционирования клетки, по-прежнему привлекают огромный интерес исследователей. Но, несмотря на активное и давнее развитие этого направления, тонкие механизмы большинства путей репарации ДНК еще не до конца выяснены. Во многом это связано с тем, что существует множество факторов регуляции их деятельности. В этой связи выявление и подробное исследование способов регуляции систем репарации ДНК является чрезвычайно важной фундаментальной задачей. Эксцизионная репарация оснований (ЭРО) играет большое значение для поддержания целостности генома и жизнеспособности клетки в целом, поскольку она ответственна за исправление наиболее многочисленных повреждений ДНК, возникающих под действием эндогенных и экзогенных агентов, в том числе лекарственных генотоксических веществ. Помимо несомненной научной ценности, исследование механизмов регуляции ЭРО представляет также существенный прикладной интерес, поскольку эта система во многом определяет резистентность раковой клетки к химиотерапевтическим агентам. К числу наиболее важных из известных белков-регуляторов процесса ЭРО относят PARP1 и PARP2. Участие PARP1 в процессах ЭРО исследовано достаточно полно, как во внеклеточных системах, так и на клеточном и организменном уровнях. Однако в последнее время выявлен целый ряд новых

белков, вовлеченных в регуляцию ЭРО. В этой связи диссертационная работа Алемасовой Е.Э., посвященная проверке гипотезы об участии мультифункционального белка YB-1 в регуляции ЭРО представляется чрезвычайно актуальной и своевременной. Особое внимание в работе уделено анализу физического и функционального взаимодействия YB-1 с белками PARP1 и PARP2.

### **Новизна исследований и полученных результатов, выводов и рекомендаций**

Диссертационная работа Алемасовой Е.Э. представляет собой по-существу пионерское исследование. Ранее в литературе достаточно широко исследовались различные аспекты функционирования белка YB-1, в основном в связи с его возможной ролью в регуляции процессов транскрипции и трансляции. Однако предложенная в диссертационной работе Алемасовой Е.Э. постановка вопроса, – исследование роли YB-1 в регуляции процесса ЭРО, ранее никем не обсуждалась. Уже по этой причине подавляющая часть представленных в работе результатов абсолютно уникальна. Среди таких наиболее ярких и оригинальных результатов – обнаружение физического и функционального взаимодействия белка YB-1 с рядом участников ЭРО, открытие факта поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 и обнаружение способности вовлеченности этого белка в регуляцию активности белков PARP1 и PARP2 при их взаимодействии с сайтами повреждения ДНК. Полученные результаты позволяют по-новому оценить роль белка YB-1 в клетке и значительно дополняют имеющиеся представления о возможных механизмах регуляции ЭРО и клеточных процессов, в которые вовлечены белки семейства PARP. Кроме того автором продемонстрирована способность белка YB-1 снижать эффективность действия ингибиторов PARP1, что может иметь крайне важное значение для понимания механизмов резистентности опухолевых клеток, с высоким уровнем экспрессии белка YB-1, к действию ингибиторов PARP-1, применяемых в качестве сенситизаторов при химиотерапии раковых опухолей. Последнее также важно для разработки новых протоколов для оценки эффективности лечения раковых опухолей в рамках персонализированной медицины.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертационная работа Алемасовой Е.Э. составлена по традиционному плану и состоит из введения, трех глав (Обзор литературы, Экспериментальная часть, Результаты и их обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 158 страницах машинописного текста, содержит 43 рисунка и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 434 наименований.

Во **введении** описана фундаментальная проблема, которой посвящена диссертационная работа и обоснована ее актуальность, приведены цель и основные задачи и практическая значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту.

**Обзор литературы** озаглавлен «Экцизионная репарация оснований ДНК эукариот и ее регуляция» и посвящен как общим, так и частным аспектам, касающимся механизмов ЭРО, путям ее регуляции и роли YB-1 в клетке. Хотелось особо подчеркнуть, что значительная часть материалов, представленных в обзоре, посвящена рассмотрению актуальных, а порой и дискуссионных аспектов функционирования ЭРО. Обзор написан хорошим научным языком, читается легко и увлекательно. Он доступен для понимания широкого круга читателей, не искушенных в тонкостях данной области науки. Обзор хорошо проиллюстрирован рисунками и схемами, что значительно облегчает его восприятие. Число источников, использованных для написания обзора, не оставляет сомнений в полноте и глубине проведенного анализа литературы. При этом существенное число публикаций приходится на последние 10 лет.

Глава «**Экспериментальная часть**» содержит подробнейшее и исчерпывающее описание использованных реагентов и методов исследования. Приведенные в ней методики описаны настолько детально, что могут служить настольным пособием для исследователей. Стоит отметить, что наряду с классическими экспериментальными методами биохимии и молекулярной биологии, автором был использован ряд оригинальных подходов, как например метод «флуоресцентного титрования» и метод измерения анизотропии флуоресцентномеченного ДНК-субстрата.

Глава «**Результаты и их обсуждение**» тематически разбита на два раздела, логически связанных между собой. Первый раздел посвящен исследованию взаимодействия YB-1 с некоторыми непосредственными участниками ЭРО, а второй - его роли в процессе поли(АДФ-рибозил)ирования белков, являющейся ключевой регуляторной системой ЭРО. Каждый из разделов представлен огромным массивом экспериментальных данных, содержащих целый ряд выявленных впервые фактов, позволяющих сделать важные, но не очевидные изначально выводы. Исследования проводились с использованием искусственных модельных систем, имитирующих различные этапы репарации ДНК, характерные для ЭРО. В работе применяли рекомбинантные белки человека, вовлеченные в ЭРО. Для выяснения функциональных участков, ответственных за белок-белковые взаимодействия, а также для выявления способности белков к образованию гетеромерных комплексов были использованы укороченные, мутантные и флуоресцентномеченные варианты этих белков.

В первой части работы автором диссертационной работы было установлено наличие физического взаимодействия YB-1 с белками системы ЭРО: APE1, NEIL1, pol  $\beta$ , PARP1 и PARP2. Измеренные методом флуоресцентного титрования значения констант, характеризующих устойчивость белок-белковых комплексов, указывают на наличие слабых взаимодействий при их формировании, что свойственно регуляторным белкам. Также было показано, что YB-1 стимулирует активность APE1 и NEIL1 по отношению к AP-сайтам в ДНК-

дуплексах и ингибирует расщепление этими ферментами нуклеотидной цепи в области AP-сайтов, локализованных в однонитевых фрагментах ДНК, что указывает на непосредственное участие YB-1 в регуляции активности ферментов, осуществляющих начальные стадии ЭРО. Выявленные разнонаправленные эффекты YB-1 также свидетельствуют о специфичности наблюдаемых регуляторных воздействий этого мультифункционального белка.

Во второй части работы автором диссертационной работы было впервые установлено, что YB-1 способен формировать комплекс с PARP1 и поврежденной ДНК, и подвергаться при этом поли(АДФ-рибозил)ированию. Также было сделано интересное наблюдение, что взаимодействие YB-1 и PARP1 внутри комплекса на начальных этапах реакции регулируются стехиометрией YB-1:ДНК, а также структурой ДНК. Показано, что при определенных условиях на этой стадии YB-1 может как стимулировать, так и подавлять активность PARP1, находящейся в комплексе с ДНК. Возможно, этот факт остался недооцененным автором ввиду множества других выявленных явлений. Можно предположить, что соотношение PARP1 и YB-1 может играть важнейшую роль в чувствительности системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков к повреждениям ДНК. Так при высокой экспрессии YB-1 и низком уровне повреждений ДНК реакция PARP1/2 на вновь возникающие повреждения ДНК будет ослаблена, что может приводить к накоплению генетических нарушений «в норме». И наоборот, при высокой экспрессии YB-1 и высоком уровне повреждений ДНК реакция PARP1/2 на вновь возникающие повреждения ДНК будет усилена (стимулирующее действие YB-1), что в случае раковых опухолей может приводить к повышению их устойчивости к химиотерапии.

Также автором было обнаружено, что YB-1 стимулирует синтез поли(АДФ-рибозы) (PAR) и снижает эффективность действия конкурентных ингибиторов PARP1. Причем YB-1 способен стимулировать активность PARP1 в отсутствие ионов  $Mg^{2+}$ , но для этого необходим его С-концевой домен. Автор предположила, что это происходит за счет взаимодействия свободной и немодифицированной формы YB-1 с PARильным остатком белка-мишени на терминальной стадии и стадии элонгации синтеза полимера. Подобные механизмы, с участием других белков с высоким pI, обсуждаются в литературе. Автор считает, что нековалентное связывание PAR белком YB-1 может способствовать увеличению времени пребывания PARP1 в каталитически активном комплексе с ДНК и защищает PAR от деградации ферментом PARG. Кроме того высокое сродство YB-1 к полимеру PAR может являться причиной снижения его активности, что может ослабить его участие в разнообразных клеточных процессах в которых он задействован. Причем не только в ядре, но и в цитоплазме, в которой фрагменты PAR могут накапливаться после длительного воздействия ДНК-повреждающих агентов.

Достоверность полученных результатов не вызывает никаких сомнений. Ее залогом является: 1)- детально продуманный план работы, 2)- адекватный выбор используемых моделей

и подходов, 3)- применение современных методов исследования; 4)- тщательностью проведения всех экспериментов и многократной их воспроизводимостью. В целом следует отметить, что полученные в данном исследовании результаты выглядят абсолютно убедительными, все выносимые на защиту положения хорошо аргументированы и подтверждены полученными результатами. Выводы сформулированы четко и позволяют без труда оценить научную и практическую значимость проведенных исследований. Следует особо отметить высокое качество первичных экспериментальных данных представленных в работе, что характеризует автора как прекрасного экспериментатора.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации и дает полное представление об объеме, научной и практической значимости полученных результатов.

### **Замечания к диссертационной работе**

Несмотря на ряд несомненных достоинств, диссертационная работа Алемасовой Е.Э не лишена недостатков. В основном они касаются оформления работы и способа представления данных.

1. Список сокращений стоило бы привести в начале изложения текста диссертации.
2. Название некоторых рисунков (см. рис. 24 и 25) следует считать неудачным. Вместо обобщенного названия, акцентирующего внимание на предмете исследования или на ключевом результате исследования, автором приводится описание условий проведения эксперимента или использованного метода исследования. Аналогичное замечание касается оформления автореферата диссертации (см. ниже).
3. В названии диссертации указывается, что работа посвящена исследованию роли YB-1 в репарации ДНК. Однако, несмотря на достаточно весомые результаты, полученные диссертантом, все же вопрос об участии YB-1 в регуляции ЭРО следует пока считать открытым. Дальнейшая проверка данной гипотезы должна основываться на данных, полученных в более сложных модельных системах, и прежде всего на живых культивируемых клетках. Следовало бы в заключении подробнее обсудить эту ситуацию и указать на ограничения, накладываемые применением выбранных искусственных модельных систем.
4. В ходе исследования автором был выявлен целый ряд разнообразных эффектов YB-1 на реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования белков, причем как со стимулирующим, так и с ингибирующим действием. В этой связи было бы целесообразно в Заключении (в диссертации и в автореферате) привести схему, суммирующую все выявленные физические и функциональные взаимодействия YB-1 и PARP1/2 при взаимодействии последних с активированной ДНК. Приводимая автором схема, иллюстрирующая феномен снижения чувствительности PARP1 к ингибитору в присутствии YB-1 кажется менее важной, так как обнаруженное явление может быть легко описано в тексте.

5. Выводы построены по оригинальному плану: два очень обобщенных вывода, соответствующих двум основным разделам работы, которые (выводы) далее несколько детализированы. Создает некоторое неудобство отсутствие привычной сплошно нумерации в списке выводов. Автору следовало бы конкретизировать некоторые выводы, упомянув использованные в работе методы и некоторые количественные характеристики. В частности следовало бы указать порядок величин EC50, характеризующие силу взаимодействия белков в комплексе (результаты «флуоресцентного титрования»). Также из вывода (последний вывод) «Поли(АДФ-рибоза) в присутствии белка YB-1 может выступать в качестве регулятора процесса поли(АДФ-рибозил)ирования» абсолютно неясно, в чем собственно состоит регуляторное действие PAR и в каких модельных ситуациях. Также хотелось бы понять, на основании каких данных автор утверждает что «Связывание YB-1 с PAR способствует увеличению времени жизни каталитически активного комплекса PARP1 с поврежденной ДНК...» (предпоследний вывод).

6. В тексте встречаются не очень удачные выражения, например, «флуоресцентное титрование», «YB-1 является эффектором PARP1, способным интерферировать», «расщепление AP-сайтов», «радиоавтограф ТХУ-фильтров», радиоавтограф ТХУ-мишеней» и ряд других.

7. Оформление автореферата. В автореферате стоило бы привести список сокращенных названий белков. Во вводной части следовало бы охарактеризовать белок YB-1 и указать, в чем состоит его мультифункциональность. В тексте нет ссылок и комментариев к рис. 5Б и 7Б. Следовало бы более четко объяснить, почему поли(АДФ-рибозил)ирование PARP1 и YB-1 зависит от концентрации активированной ДНК (рис. 7А). Название ряда рисунков следует считать неудачными (см. рис. 4, 5, 8, 9, 10, 11). Вместо обобщенного названия, акцентирующего внимание на предмете исследования или на ключевом результате исследования, автором приводится описание условий проведения эксперимента или использованного метода исследования.

Однако имеющиеся в работе отдельные недостатки не носят принципиального характера и не снижают высокую научную и практическую значимость полученных автором результатов, их достоверность, а также корректность сформулированных выводов.

### **Научная и практическая значимость работы**

Диссертационная работа Алемасовой Е.Э. содержит ряд «прорывных» достижений, имеющих несомненную научную и практическую значимость. Полученные соискателем результаты способны значительно расширить имеющиеся на сегодняшний день «классические» представления о механизмах ЭРО и путях ее регуляции в норме и при патологиях. Важным достижением работы является создание фактических предпосылок для формулирования новых научных гипотез. Дальнейшее развитие идей, вытекающих из диссертационной работы

Алемасовой Е.Э., может дать весьма плодотворные результаты в исследованиях, проводимых в целом ряде научных центров, включая Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ и др. С практической точки зрения, очевидным применением результатов диссертационной работы Алемасовой Е.Э. может стать разработка новых подходов для персонализированной медицины, в частности, для оценки химиорезистентности раковых опухолей индивидуальных пациентов и разработки персональных протоколов их лечения. Соответствующие аспекты, вытекающие из работы Алемасовой Е.Э., могут быть развиты и доведены до их практического применения в таких научных учреждениях как Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина, Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена, Медико-генетический научный центр РАМН и др. Отработанные автором оригинальные методы исследования могут также широко применяться в практической работе в различных научных учреждениях, а полученные новые теоретические сведения – в учебном процессе для студентов и аспирантов факультетов биологического и медицинского профиля.

#### **Публикации и апробация работы**

Содержание диссертационной работы достаточно полно представлено в публикациях. По теме диссертации опубликовано 6 научных статей в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах. Причем в 5 из них Алемасова Е.Э. является первым автором, что указывает на решающий вклад соискателя в выполненных исследованиях. Результаты работы также были представлены на 9 международных и отечественных научных форумах.

#### **Заключение о соответствии диссертации и автореферата, предъявляемым требованиям**

Диссертационная работа Алемасовой Е.Э. «Мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1: исследование его роли в репарации ДНК», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалифицированной работой, в которой **решена важная научная задача**: установлена потенциальная возможность оказания белком YB-1 регуляторного воздействия на систему ЭРО и установлено участие этого белка в регуляции процесса поли(АДФ-рибозил)ирования белков – ключевого механизма в координации стресс-индуцированных клеточных реакций. Учитывая это научное достижение, а также актуальность выбранной темы, объем и качество выполненных исследований, научную новизну и практическую значимость полученных результатов, можно сделать заключение, что рассматриваемая диссертационная работа отвечает всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, перечисленным в п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а

ее автор, Алемасова Елизавета Эдуардовна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв на диссертационную работу Алемасовой Елизаветы Эдуардовны «Мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1: исследование его роли в репарации ДНК», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, был заслушан и утвержден на межлабораторном научном семинаре Отдела химии физиологически активных веществ (ОХФВ) и Группы «Специализированные ДНК-полимеразы» ИМГ РАН 30 марта 2018г.

Заведующий Сектором нейрофармакологии  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Институт молекулярной  
генетики Российской академии наук,  
кандидат химических наук



**Шрам Станислав Иванович**

*Подпись Шрама С.И. удостоверяю*

Ученый секретарь Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки  
Институт молекулярной генетики Российской  
академии наук,  
кандидат биологических наук



**Андреева Людмила Евгеньевна**

123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт молекулярной  
генетики Российской академии наук (ИМГ РАН)  
[www.img.ras.ru](http://www.img.ras.ru)  
Тел. +7(499)196-0213  
E-mail: [shram@img.ras.ru](mailto:shram@img.ras.ru)