

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Алемасовой Елизаветы Эдуардовны «Мультифункциональный белок YB-1: исследование его роли в репарации ДНК», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы. Исследование систем репарации ДНК является в настоящее время одним из активно развивающихся направлений современной биохимии. Связано это, прежде всего с тем, что эти системы контролируют генетическую стабильность живых организмов, нарушение которой ведет к ряду патологических процессов, в первую очередь, к процессам злокачественной трансформации. Еще одним важным аспектом функционирования систем репарации ДНК является развитие в трансформированной клетке резистентности к лечению ДНК-тропными препаратами, широко применяемыми в современной клинической онкологии. Все это ставит задачу перед современными биохимиками: изучать молекулярные механизмы ферментативной защиты ДНК от различных химических и радиационных повреждений. Эксцизионная репарация оснований ДНК (base excision repair, BER) является одной из таких систем, включающая этапы распознавания и удаления поврежденного основания, расщепление образующегося апуринового/апиримидинового сайта (AP-сайта), заполнение бреши и лигирование разрыва ДНК. Однако к настоящему времени молекулярные события, обеспечивающие эффективность и точность процесса BER, реконструированы не полностью, как и механизмы, регулирующие активность этой системы. Целью диссертационной работы Алемасовой Е.Э. являлось исследование роли мультифункционального Y-бокс-связывающего белка 1 (YB-1) в регуляции активности ключевых ферментов BER (APE1, NEIL1, pol β), а также его участие в синтезе поли(АДФ-рибозы), катализируемой PARP1. Принимая во внимание роль

BER в развитии химиорезистентности и возможное участие белка YB-1 в этом процессе, можно говорить о высокой степени актуальности исследуемой научной проблемы.

Научная новизна диссертационной работы Алемасовой Е.Э. не вызывает сомнения. Учитывая тот факт, что роль YB-1 в регуляции ферментов BER мало исследована, многие результаты были получены, действительно, впервые. Так, автором впервые получены константы взаимодействия YB-1 с рядом белковых факторов BER. Некоторые из взаимодействий YB-1 с белками системы BER описаны впервые. Впервые показана способность белка YB-1 стимулировать расщепление апуриновых/апиримидиновых (AP-) сайтов, локализованных в двухцепочечной ДНК и ингибировать расщепление AP-сайтов, расположенных в одностранных фрагментах ДНК. Автором открыта новая посттрансляционная модификация YB-1 – поли(АДФ-рибозил)ирование, катализируемое белками PARP1 и PARP2 в присутствии повреждённой ДНК. Впервые показано, что YB-1 способен формировать гетеромерные комплексы с PARP1 и ДНК, регулируя активность PARP1 на начальных этапах реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. Впервые установлено, что YB-1 стимулирует активность PARP1 в отсутствие ионов Mg^{2+} и, как следствие, может влиять на эффективность действия ингибиторов PARP1. Установлено, что синтез поли(АДФ-рибозы) индуцирует диссоциацию комплексов YB-1-ДНК и связывание YB-1 с полимерами PAR. Показано, что нековалентное связывание поли(АДФ-рибозы) белком YB-1 способствует увеличению времени жизни комплекса PARP1 с повреждённой ДНК и защищает полимер PAR от деградации поли(АДФ-рибоза) гликогидролазой (PARG). Впервые показана возможность регуляции реакции поли(АДФ-рибозил)ирования продуктом реакции (PAR) в присутствии YB-1.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. Результаты диссертационной работы

Алемасовой Е.Э. могут представлять интерес, как для фундаментальной, так и прикладной науки. Данные, устанавливающие белок-белковые взаимодействия ферментов BER с участием YB-1 позволяют реконструировать последовательность молекулярных событий в присутствии ДНК-субстрата, что важно для понимания механизмов BER. Установление того факта, что YB-1 поли(АДФ-рибозил)ируется и регулирует процесс синтеза поли(АДФ-рибозы), также помогает понять механизмы BER на ее начальных этапах. Результаты диссертационной работы имеют также и практическое значение, так как YB-1 можно рассматривать как одну из мишеней в разработке стратегии преодоления химиорезистентности клеток опухолей при лечении онкологических заболеваний.

Степень достоверности и обоснованности полученных результатов.

Автором лично проведены все основные эксперименты по изучению роли YB-1 в регуляции BER. Все исследования проведены с привлечением современных экспериментальных биохимических методик, а полученные результаты обработаны с использованием современных методов статистики, применяемых в биохимических исследованиях. При проведении исследования использованы адекватные контрольные эксперименты. Поэтому достоверность и обоснованность полученных автором результатов не вызывает сомнения.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Алемасовой Е.Э. изложена на 164 страницах машинописного текста и содержит 44 рисунка и 4 таблицы. Она включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, выводы, список цитируемой литературы, состоящий из 434 источника.

Во введении автор обосновано представляет актуальность выбранного исследования, на основании чего четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен эксцизионной репарации оснований у

эукариот и ее регуляции. Он состоит из пяти глав, где первая глава посвящена общей информации о системе BER. Главы 2 и 3 посвящены регуляции процессов BER и роли BER в регуляции метаболизма РНК. В 4-й главе представлена информация о роли РНК-связывающих белков и поли(АДФ-рибозы) в репарации ДНК. Наконец, в 5-й главе дана характеристика YB-1 белка. В целом, в обзоре, представлены необходимые современные данные по исследуемой проблеме. Автором проанализированы проблемы, касающиеся роли YB-1 в регуляции BER, в том числе его роли, как онкогена, особенно при развитии химиорезистентности.

Материалы и методы исследования адекватны поставленной цели и решаемым задачам. В работе использован набор современных методов биохимии с использованием рекомбинантных аналогов белков человека и модельных ДНК-структур, имитирующих поврежденную ДНК. В работе проводилось выделение и очистка рекомбинантных белков, электрофоретическое разделение белков и олигонуклеотидов, использовался метод задержки ДНК в геле, флуоресцентное титрование, Вестерн-блот анализ и метод флуоресцентной спектроскопии.

В 3-й главе «Роль мультифункционального белка YB-1 в регуляции репарации ДНК», где представлены результаты собственных исследований, последовательно приводятся экспериментальные данные о взаимодействии белка YB-1 с белками репарации BER, его влиянии на активность ферментов APE1, NEIL1, pol β . Вторая часть этой главы посвящена исследованию роли YB-1 в регуляции поли(АДФ-рибозил)ирования. Автор квалифицированно анализирует все полученные результаты, на основании которых формулируются выводы и заключение. В целом, считаю, что диссертационная работа Алемасовой Е.Э. выполнена на высоком научно-методическом уровне.

Результаты проведенного исследования приводят к важному выводу, что Y-бокс-связывающий белок, будучи классическим РНК-связывающим белком и транскрипционным фактором, может также участвовать в

процессах репарации ДНК, выполняя роль стабилизатора в мультибелковых комплексах в присутствии поврежденной ДНК. Такие результаты, без сомнения, представляют интерес для научно-исследовательских учреждений, занимающихся проблемами генетической стабильности и репарации ДНК. Использование результатов исследования, полученных Алемасовой Е.Э., представляется также целесообразным для биохимиков, генетиков, молекулярных и клеточных биологов.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на многих всероссийских и международных конференциях, посвященных проблемам репарации ДНК. По результатам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Выводы диссертации соответствуют цели, задачам и основным положениям. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Вместе с тем, при прочтении работы у меня появились некоторые вопросы:

1. Возник вопрос о понятии «физического и функционального» взаимодействия белка YB-1 с другими белками (стр. 66). Не ясно, какой смысл автор вкладывает в эти определения, и позволяют ли полученные результаты различать такие взаимодействия?

2. Есть замечание к выводу № 1, об участии YB-1 в регуляции активности ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК (BER), где представлены, главным образом, качественные характеристики. На мой взгляд, выводы должны отражать количественные параметры: константы взаимодействия, скорости и пр. биохимические показатели.

3. Хотелось бы знать мнение автора о том, как исследуемые искусственные системы белок-белковых взаимодействий при активации BER соотносятся к подобным взаимодействиям в системах *in vivo*? Существуют ли ткане-специфичные различия?

Следует отметить, что приведенные выше вопросы носят дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки выполненной

работы.

Заключение. Диссертационная работа Алемасовой Елизаветы Эдуардовны «Мультифункциональный белок YB-1: исследование его роли в репарации ДНК», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для современной биохимии – установлении влияния белка YB-1 на активность ферментов BER, что важно для понимания систем репарации ДНК. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов в рецензируемых печатных научных изданиях работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждения ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автору Алемасовой Елизавете Эдуардовне следует присудить ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент

доктор биологических наук по специальностям 03.01.03 и 03.01.04, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального исследовательского центра «Фундаментальная и трансляционная медицина» 630117, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12, Тел. 8(383) 335-98-47 imbb@niimbb.ru http://niimbb.ru

Гуляева Людмила

Федоровна



30 марта 2018 г.