

Отзыв официального оппонента

на диссертацию Алемасовой Елизаветы Эдуардовны на тему «Мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1: исследование его роли в репарации ДНК», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04. - «биохимия»

Повреждения азотистых оснований являются одними из наиболее часто возникающих спонтанных повреждений ДНК. Элиминация таких повреждений критически важна для поддержания жизнеспособности клетки. Будучи незарепарированы, они могут приводить к накоплению мутаций, в том числе и онкогенных, а также к образованию гораздо более опасных для клетки однонитевых и двунитевых разрывов ДНК. Ключевой системой удаления повреждений азотистых оснований является эксцизионная репарация оснований (BER, base excision repair). Молекулярный механизм БЕР известен давно и достаточно хорошо изучен. В течение последнего десятилетия все больше внимания при изучении БЕР уделяется механизмам регуляции этого процесса. Обнаружены белковые факторы, не задействованные напрямую в репарации, но участвующие в регуляции активности ферментов БЕР и индукции внутриклеточных сигнальных каскадов, необходимых для эффективной репарации и сохранения жизнеспособности клеток. Одним из наиболее важных таких факторов является, безусловно, поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1). Важно отметить, что инактивирующие мутации белков-участников БЕР характерны для многих типов раков, что делает такие опухоли более чувствительными к химиотерапевтическим препаратам, индуцирующим повреждения азотистых оснований ДНК. Более того, для специфической элиминации раковых клеток, несущих мутации в генах факторов БЕР, возможно также использование относительно новой терапевтической стратегии, основанной на феномене синтетической летальности. Однако, для всего этого требуется по возможности исчерпывающее знание не только основных биохимических этапов БЕР, но и молекулярных механизмов регуляции этого репаративного процесса. Все сказанное выше обуславливает актуальность и практическую значимость работы Е.Э. Алемасовой, посвященной исследованию регуляторной роли Y-бокс-связывающего белка 1 (YB-1) в процессе эксцизионной репарации оснований.

Диссертационная работа объемом 158 страниц включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть (материалы и методы)», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». В диссертации процитировано 434 работы; работа содержит 43 рисунка и 4 таблицы.

Обзор литературы состоит из пяти основных частей, планомерно подводящих читателя к постановке экспериментальных задач. Первые три раздела полностью посвящены БЕР. В первой и второй главах подробным образом описываются основные схемы БЕР и регуляция этого процесса, соответственно. В третьей главе речь идет об участии ферментов БЕР в репарации РНК. Далее автор останавливается на роли РНК-связывающихся белков и поли(АДФ-рибозы) (PAR) в репарации ДНК (глава 4). Последняя часть обзора литературы полностью посвящена белку YB-1 – его структурно-функциональной организации, взаимодействию с другими белками и нуклеиновыми кислотами и роли в онкогенной трансформации клеток. В целом, обзор литературы написан хорошим языком, очень логично, хорошо иллюстрирован и содержит необходимые сведения для понимания представленных в работе экспериментальных данных. Несмотря на то, что обзор литературы заканчивается небольшим заключением, удачным было бы в нем привести и обосновать экспериментальные задачи настоящей работы. Кроме того, иногда автор использует несколько более поэтичные названия разделов, чем, возможно, стоило бы (см., например, раздел 1.3.2), а также не существующие в русском языке знаки препинания (стрелки вместо тире в названиях разделов 1.1.1-1.1.3).

Раздел «Материалы и методы» написан достаточно подробно. Ознакомление с этим разделом позволяет воспроизвести использованные автором методы без привлечения специальной литературы. Несомненно, автор является высококвалифицированным исследователем, владеющим большим арсеналом молекулярно-биологических и биохимических методов.

Экспериментальные результаты работы изложены в виде двух обособленных глав в разделе «Результаты и обсуждение». Первая часть посвящена идентификации взаимодействий YB-1 с белками-участниками БЕР и исследованию возможной функциональной роли таких взаимодействий. Сначала автор с помощью метода

флуоресцентного титрования идентифицировала факторы БЕР, которые способны взаимодействовать с белком YB-1, после чего проанализировала влияние такого взаимодействия на активность AP-эндонуклеазы APE1, ДНК-гликозилазы NEIL1 и ДНК-полимеразы бета. В целом выводы о взаимодействии YB-1 с различными участниками БЕР выглядят вполне обоснованными, однако, хотел бы посоветовать автору, все-таки, быть более аккуратной в формулировках, учитывая те ограничения, которые исходят из использованных для анализа методов. Полученные результаты свидетельствуют только о потенциальной возможности таких белок-белковых взаимодействий *in vitro* и ничего не говорят о том, реализуются ли они *in vivo*. Оптимальным было бы подтверждение полученных данных с помощью ко-иммунопреципитации белков из клеточного лизата и/или использование дрожжевой двугибридной системы. Кроме того, у меня есть вопросы по дизайну экспериментов и небольшие замечания к интерпретации некоторых результатов, представленных в этом разделе диссертации.

На с. 66-67 автор пишет, что для детекции взаимодействия APE1 и YB-1 был использован содержащий флуоресцентную метку белок APE1, а не YB-1 как во всех остальных случаях (FAM-APE1 + YB-1). Не ясно, почему реципрокный эксперимент (FAM-YB-1 + APE) не дал результата, подтверждающего взаимодействие этих белков. Причины негативного результата надо было, хотя бы, обсудить.

Рис. 11: при анализе взаимодействий YB-1 с белками БЕР методом флуоресцентного титрования было бы логично использовать с FAM-YB-1 положительный и отрицательный контроли – хорошо известный белок-партнер YB-1 и белок, с ним не взаимодействующий (хотя бы, БСА).

Рис. 11: из графиков А-Г очевидно, что короткая мутантная форма YB-1 «лучше» взаимодействует с белками БЕР, чем полноразмерный YB-1. Потенциальные причины этого стоило бы обсудить.

Рис. 12: с помощью метода флуоресцентного титрования автором показано, что мультимеризация YB-1 возможна только в присутствии ДНК. В то же время, в обзоре литературы, на с. 43, приводятся данные о том, что свободный YB-1 способен

мультимеризоваться (ссылка #311). Не ясно, с чем могло бы быть связано противоречие в полученных автором и опубликованных ранее данных.

На с. 79 автор пишет: «...мы обнаружили, что YB-1 теряет способность стимулировать мутантный белок [APE1]» (рис. 18). Как это согласуется с тем, что этот же мутантный белок способен, согласно данным на рис. 11, взаимодействовать с YB-1?

Вторая часть главы «Результаты и обсуждение» посвящена исследованию участия YB-1 в регуляции активности PARP1. Автором убедительно продемонстрировано, что YB-1 может быть поли(АДФ-рибозил)ирован ферментами PARP 1 и PARP2. Была исследована функциональная роль этой посттрансляционной модификации YB-1. Показано, что YB-1 способен как стимулировать активность PARP1, так, при избыточной концентрации, и ингибировать ее активность. Интересно, что связывание YB-1 с PAR способствовало увеличению времени жизни каталитически активного комплекса PARP1 с поврежденной ДНК и защищало полимер PAR от деградации. Выводы, сделанные по представленным в этой части результатам, выглядят полностью обоснованными. Более того, хотел бы подчеркнуть, что проведен практически исчерпывающий анализ взаимодействия YB-1 с системой поли(АДФ-рибозил)ирования, по крайней мере, *in vitro*. Поэтому к экспериментам и выводам, представленным в этой главе, у меня также есть крайне незначительные замечания.

На с. 87 автор пишет, что радиоавтографы на рис. 24А свидетельствуют о формировании тройных комплексов YB-1-PARP1-ДНК. На мой взгляд, по представленным данным не очевидно, насколько они демонстрируют формирование именно тройных комплексов, а не набора «двойных» комплексов.

На рис. 24Б было бы правильно представить средние значения нескольких экспериментов. Кроме того, стоило бы использовать негативный контроль – заменить PARP1 каким-нибудь нейтральным белком, чтобы общая концентрация белка была сравнима с таковой в образце ДНК+PARP1+YB-1.

Должен отметить, что сделанные замечания не влияют на общее очень хорошее впечатление от работы. В целом, диссертация написана логично и понятно. Все полученные

данные оригинальны и, безусловно, будут интересны широкому кругу молекулярных и клеточных биологов. Обоснованность выводов, сделанных на основании полученных результатов, сомнений не вызывает. Автореферат полностью отражает существо работы. По теме диссертации автором опубликовано 6 научных статей (в том числе в журналах ВВА, Biochimie), в пяти из которых Е.Э. Алемасова занимает первое место в списке авторов.

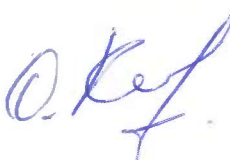
Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы, ее теоретическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Е.Э. Алемасовой «Мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1: исследование его роли в репарации ДНК» является законченной научно-квалификационной работой, в ходе которой разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как достижение в области биохимии и молекулярной и клеточной биологии. Диссертация полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, а ее автор, Елизавета Эдуардовна Алемасова, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией стабильности генома
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН),
доктор биологических наук (по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»)

Омар Леванович Кантидзе

/О.Л. Кантидзе/

26.03.18. 

Контактные данные:

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5
Сайт: www.genebiology.ru
Тел.: (499)135-97-87
E-mail: kantidze@gmail.com

