

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ и ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)**

Пр-т. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
http://www.bionet.nsc.ru
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

23.04.2018 № *15845-32-2171/281*

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО директора ФГБНУ
«Федеральный исследовательский
центр Институт цитологии и
генетики Сибирского отделения
Российской академии наук» (ФИЦ
ИЦиГ СО РАН)

С.В. Лаврушев

«3» апреля 2018 года



ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ ИЦиГ СО РАН) – на диссертационную работу Косовой Анастасии Андреевны на тему «Взаимодействие многофункциональных белков человека – Ku-антигена и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы – с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами в ДНК», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

ДНК всех организмов постоянно подвергается разнообразным и многочисленным модификациям при воздействии множества факторов различной природы. От того, как клетка способна исправлять данные модификации, зависит тот сценарий, по которому данная клетка реализует свой потенциал: будет ли клетка функционально полноценной, трансформируется или же погибнет. Апуриновые/апиримидиновые (АП) сайты являются самыми многочисленными из всего возможного спектра модификаций ДНК. Практически все мутагенные факторы, независимо от их природы, в той или иной степени провоцируют образование АП сайтов. Интенсивность формирования АП сайтов в различных участках генома зависит не только от дозы воздействия конкретного повреждающего агента, но и от функционального состояния клетки, а также от структуры

ДНК в данном локусе. AP сайты способны влиять на все процессы метаболизма ДНК (репликацию, транскрипцию, мутагенез и т.д.). Жизнеспособность любой клетки зависит от того, насколько эффективно и корректно будут распознаваться и исправляться AP сайты. К настоящему моменту в клетках эукариот идентифицированы основные механизмы и ферменты, задействованные в процессе репарации AP сайтов. Очевидно, что эти механизмы множественны, они часто перекрываются и дублируются, обеспечивая надежность процесса репарации. Однако детали координации репарационных ансамблей, их переключение с одного типа на другой в зависимости от конкретной ситуации, интенсивности накопления повреждений остаются во многом не исследованными. В связи с этим **актуальность** работы по идентификации многофункциональных белков, способных связываться с AP сайтами в составе кластерных (множественных) локализаций, а также исследование деталей их взаимодействия с ДНК, содержащей такие повреждения не вызывает сомнений.

Научная новизна работы определяется тем, что в результате исследования было решено несколько важных как прикладных, так и фундаментальных задач. Был усовершенствован метод идентификации белков, взаимодействующих с AP-сайтами, с помощью комбинации аффинной модификации, аффинной хроматографии и MALDI-TOF масс-спектрометрии, позволяющий повысить надежность и информативность данной методологии. Подробно охарактеризовано взаимодействие Ku-антигена с AP-сайтами. Впервые была показана способность Ku расщеплять AP-сайты в составе определенного типа двухцепочечной ДНК, и установлен механизм данной реакции. Показано, что Ku способен инициировать запасной APE1-независимый путь репарации AP-сайтов, который может реализовываться в клетках при дефиците AP-эндонуклеазной активности. Впервые обнаружено и детально изучено взаимодействие гликолитического фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) с AP-сайтами. Показана ее способность формировать с данными повреждениями как богидрид-зависимые, так и боргидрид-независимые (необратимые) ковалентные аддукты, которые могут образовываться в клетках в условиях окислительного стресса. Взаимодействие GAPDH с AP-сайтами, вероятно, препятствует их репарации и может быть одним из факторов, приводящих к клеточной гибели. Полученные данные позволяют углубить знания о механизмах клеточного ответа на AP-сайты, что имеет большое значение для таких практических областей, как разработка методов терапии онкозаболеваний.

Общая характеристика

Диссертационная работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Также текст диссертации включает 4 приложения, в которых приведены технические детали идентификации белков Ku 80, Ku 70 и GAPDH.

В первой главе диссертации представлен обзор литературы, в котором автор приводит сведения о структуре AP сайтов и путях их репарации в клетках эукариот. Основное внимание автор уделит современным представлениям о роли многофункциональных белков Ku 80, Ku 70 и GAPDH.

В целом, обзор литературы включает в себя информацию из 222 источников, большая часть которых относится к работам последних лет, и позволяет сделать вывод об актуальности, новизне и практической ценности рецензируемой диссертационной работы.

Во второй главе приведена подробная информация об использованных материалах и методах исследования. Возможно, автору следовало привести более подробную характеристику использованных в диссертационной работе клеточных линий, а также вынести в отдельный подраздел информацию об использованном приборном парке.

Основные результаты и их достоверность

В третьей главе изложены результаты работы и их обсуждение. Раздел включает в себя три подраздела: «Идентификация белков клеточных экстрактов человека, формирующих сшивки с AP-сайтами», «Исследование взаимодействия Ku с ДНК, содержащими AP-сайты» и «Исследование взаимодействия GAPDH с ДНК, содержащими повреждения, и ферментами репарации». В первом подразделе автор подробно описывает методологию экспериментальной идентификации белков способных образовывать комплексы с AP-содержащей ДНК и приводит убедительные доказательства надежности идентификации белков Ku 80, Ku 70 и GAPDH. Важный момент: для увеличения выхода сшивок целевых белков с ДНК и снижения уровня неспецифических сшивок автором была введена стадия обогащения клеточных экстрактов по целевым белкам за счет сульфат-аммонийного осаждения белков и/или методов хроматографии. Это позволило получить необходимое для идентификации количество продуктов сшивки белок-ДНК без использования высоких концентраций белков экстрактов и/или ДНК.

Второй раздел подробно описывает взаимодействие Ku с AP-сайтами. В частности, автором было установлено, что эффективность формирования боргидрид-зависимых аддуктов Ku с AP-ДНК зависит от ее структуры. Эффективность образования 100-кДа аддукта Ku80-DDE-AP-ДНК обусловлена определенным сочетанием длины выступающих концов, основания напротив AP-сайта и положения AP-сайта в цепи. Ku-антиген способен

расщеплять AP-сайты в составе DDE-AP-ДНК, причем, в отличие от аналогичного AP-ДНК-дуплекса с тупыми концами; расщепление происходит по механизму β -элиминирования и более эффективно для апуриновых сайтов. Этот момент представляется особенно важным, так как, проявляя AP-лиазную активность, Ku-антиген возможно способен инициировать запасной APE1-независимый путь репарации AP-сайтов.

В третьем подраздел главы «Результаты и обсуждение» автор впервые продемонстрировала, что GAPDH эффективно формирует аддукты с DDE-AP-ДНК и одноцепочечной AP-ДНК, в отличие от AP-ДНК-дуплекса с тупыми концами, и при этом не проявляет значимой AP-лиазной активности. GAPDH так же способна формировать аддукты с AP-ДНК, расщепленной по механизму β -элиминирования. GAPDH образует как боргидрид-зависимые, так и боргидрид-независимые аддукты с AP-ДНК. Автор показала, что образование аддуктов GAPDH-AP-ДНК ингибируется NAD^+ . Восстановление дисульфидных мостиков в GAPDH приводит к резкому уменьшению образования сшивок с AP-ДНК. Этот факт может иметь принципиальное значение для понимания механизмов координации систем репарации и клеточного ответа в условиях окислительного стресса

В целом диссертация производит очень хорошее впечатление: автором проделан огромный объем работы, применены самые современные технологии, обсуждение литературы проведено с использованием современных литературных данных, автором найдены принципиально новые данные, сформулированы интересные гипотезы.

По диссертационному исследованию имеются некоторые вопросы и замечания:

1. Автором использован широкий набор модельных олигонуклеотидов, синтезированных и анализированных по стандартным протоколам в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН. Однако олигонуклеотиды, содержащие AP сайты были получены автором непосредственно перед их использованием в экспериментах. К сожалению, в работе не приведены данные по анализу таких олигонуклеотидов, соответственно, не очень понятно, какова степень модификации (наличия AP сайтов) в составе используемых одонитевых и двунитевых фрагментов ДНК.
2. Аналогично в работе отсутствуют данные по анализу чистоты препаратов белков: Ku-антигена и GAPDH, полученных автором. Такая информация представляется крайне важной для адекватной интерпретации экспериментальных данных представленных в диссертационной работе.
3. Автором приводятся количественные оценки ряда анализируемых параметров связывания исследуемых белков, а также их активностей, но не приведены

конкретные алгоритмы количественных оценок и их сравнений. Все, что привел автор в разделе «Материалы и методы», стр. 55, это ссылка на приборный парк и пакет программ «Quantity One» v.4.6.3. Далее по всему тексту следует ссылка «анализировали продукты реакции как описано выше». Этого недостаточно, т.к. отсутствие четкой информации о методологии и алгоритмах количественных оценок не позволяет оценить таковые, особенно если приводятся данные в %, которые непонятно как подсчитывались. Например, влияние GAPDH на параметры ферментативной активности APE 1 эндонуклеазы (20% vs 12 %), стр. 106

Перечисленные недочеты и замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической значимости работы. Не вызывает сомнений, что результаты исследования достоверны, выполнены на достаточном материале хорошо аргументированы и подтверждены экспериментальными данными полученными с использованием современных методов проведения научных исследований. Выводы диссертационной работы корректны и полностью обоснованы полученными экспериментальными данными. По материалам диссертации опубликовано 5 научных статей в рецензируемых журналах. Все журналы индексируются в международных базах Web of Science и/или Scopus. Результаты работы были представлены на 15 международных и российских конференциях. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Значимость работы для науки и практики

Разработанные автором методы идентификации белков/белковых ансамблей, взаимодействующих с ДНК, наверняка найдут себе применение и в других областях молекулярной биологии и биохимии, включая те, которые не связаны прямо с процессами репарации. Опубликованные подходы и методики, а также новые научные данные могут найти свое применение в таких ведущих институтах РАН как - ФГБУН Институте молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта РАН, Институте биохимии имени А.Н.Баха РАН, Институте белка РАН и других научных учреждениях РФ биологического, химического и медицинского профиля.

Заключение

Диссертация Косовой Анастасии Андреевны является завершенным научным исследованием, выполненным автором самостоятельно на высоком научном уровне и посвященным изучению взаимодействия многофункциональных белков человека: Ку-антигена и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы – с апуриновыми/ апириими-новыми

сайтами в ДНК. Выводы к диссертационной работе соответствуют поставленным цели и задачам.

Рассматриваемая диссертационная работа по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне полученных результатов полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №824), предъявляемых к кандидатским диссертациям, так как в работе решена научная задача, имеющая существенное значение для понимания механизмов репарации ДНК, а ее автор, Косова Анастасия Андреевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв на диссертационную работу Косовой А.А. подготовлен в лаборатории генной инженерии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ ИЦиГ СО РАН), обсужден и утвержден на заседании лаборатории 29 марта 2018 года.

Ведущий научный сотрудник лаборатории
генной инженерии ФИЦ ИЦиГ СО РАН,
к.б.н.

Синицына О.И

Почтовый адрес: 630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д.10,
E-mail: olgasin1@yandex.ru

Подпись О.И. Синицыной заверяю
Ученый секретарь ФИЦ ИЦиГ СО РАН,
к.б.н.



Орлова Г.В.