

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Анастасии Андреевны Косовой «Взаимодействие многофункциональных белков человека — Ku-антигена и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы — с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами в ДНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Актуальность темы диссертационной работы А.А. Косовой не вызывает никаких сомнений. Процессы репарации являются очень важными для жизнедеятельности всех типов клеток и, следовательно, исследование тонких механизмов их регуляции имеет большую научную и практическую ценность. При этом основное внимание в работе уделено взаимодействию многофункциональных белков — Ku-антигена и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) — с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами в ДНК. Оба белка обладают множеством побочных функций, причем сведения об этих функциях часто очень противоречивы. Особенно много информации о «побочных функциях» глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, так как этот фермент практически всегда находят в составе любых выделяемых фракций, поскольку содержание этого белка в клетках составляет 5–15 процентов от количества всех растворимых белков. Естественно, что всегда возникает вопрос, насколько специфическим является взаимодействие ГАФД с той или иной биомолекулой или структурой. Разобраться в этом вопросе не всегда просто, но необходимо. Таким образом, даже этот аспект диссертационной работы уже достаточен, чтобы признать ее актуальность.

Диссертация А.А. Косовой довольно большая, она изложена на 154 страницах, содержит введение, три главы, заключение, выводы, список литературы (222 наименования) и 4 приложения. Работа хорошо иллюстрирована 46 рисунками и 4 таблицами. Хорошо и подробно написан автореферат диссертации, позволяющий оценить и объем работы, и ее важность.

Какие же основные результаты были получены в работе? Прежде всего, автору удалось найти в клетках человека белки, взаимодействующие с апуриновыми/апиримидиновыми (AP) сайтами в ДНК и идентифицировать их с помощью аффинной хроматографии и масс-спектрометрического анализа. При этом было показано, что белок в составе 100-кДа аддукта представлен Ku80-субъединицей Ku-антигена, а в состав 45-кДа аддукта входит глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Эти наблюдения были затем подтверждены с использованием белков (Ku-антигена и ГАФД), выделенных в

индивидуальном состоянии из клеток человека. Подробно было изучено влияние на эффективность образования аддуктов структуры AP-ДНК. Было показано также, что на эффективность образования аддуктов ГАФД с AP-сайтами в ДНК влияет кофактор фермента (NAD), а также состояние ее сульфгидрильных групп. Так, присутствие кофактора или восстановление сульфгидрильных групп фермента препятствует образованию аддуктов.

Очень важным представляется наблюдение о способности Ku-антигена расщеплять AP-сайты в составе DDE-AP-ДНК, в отличие от аналогичной AP-ДНК с тупыми концами. Этот факт является свидетельством участия Ku-антигена в репарации AP-сайтов в ДНК.

Не менее важными представляются данные об отсутствии у ГАФД урацил-ДНК-гликозилазной (UDG) активности, ранее показанной в работе (Meyer-Siegler et al., 1991), но не обнаруженной затем в работах других исследователей. Благодаря этой информации можно закрыть вопрос о наличии такой активности у ГАФД. Кроме того, данные, полученные в представленной работе, свидетельствуют в пользу «отрицательной» роли ГАФД в репарации и ее проапоптотического действия.

Все сказанное говорит о том, что в работе А.А. Косовой не просто исследовано взаимодействие двух белков с AP-сайтами ДНК, а получены ответы на некоторые вопросы, имеющие общее значение для понимания механизмов функционирования клетки.

Есть одно небольшое замечание. Авторы полагают, что окисление ГАФД приводит к образованию дисульфидной связи между двумя остатками цистеина, содержащимися в активном центре фермента. При этом восстановление этого типа дисульфидных связей препятствует образованию ее аддуктов с AP-ДНК. Это предположение даже вынесено в выводы: «GAPDH теряет способность образовывать аддукты с AP-ДНК после восстановления дисульфидных мостиков в составе белка». Лучше было бы ограничиться фразой об окислении и восстановлении цистеиновых остатков, поскольку строгие доказательства образования именно дисульфидных связей отсутствуют. Однако сути сделанных наблюдений этот вывод не меняет.

Безусловно, данное замечание не умаляет ценности представленной работы. Таким образом, можно с уверенностью сказать, что А.А. Косовой была проведена большая, интересная и важная фундаментальная работа. Основные результаты работы изложены в автореферате диссертации и опубликованы в 5 рецензируемых научных журналах. 2 статьи опубликованы в отечественных журналах («Молекулярная биология» и «Биохимия»), а 3 – в престижных международных изданиях. Сделанные автором выводы соответствуют полученным результатам.

Таким образом, диссертационная работа Анастасии Андреевны Косовой «Взаимодействие многофункциональных белков человека — Ku-антигена и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы — с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами в ДНК», является законченным (в рамках поставленных задач) квалификационным научным исследованием, представляющим научно-практическую ценность в области биохимии и смежных дисциплин, и имеет большое значение для понимания механизмов репарации, апоптоза и других процессов. При этом по своему содержанию она полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 N 842, которые предъявляются к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Анастасия Андреевна Косова заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Владимир Израилевич Муронец

доктор биологических наук, профессор,

зав. отделом биохимии животной клетки

Научно-исследовательского института физико-химической биологии

имени А.Н. Белозерского Федерального государственного

бюджетного образовательного учреждения высшего

образования «Московский государственный

университет имени М.В.Ломоносова»

Контактный телефон: +7(495)939-14-56

Рабочий адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40

Официальный сайт МГУ: www.msu.ru

E-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru

«_02_» апреля 2018 г.



Подпись В.И. Муронца заверяю

Директор Научно-исследовательского института физико-химической биологии

имени А.Н. Белозерского Федерального государственного

бюджетного образовательного учреждения высшего

образования «Московский государственный

университет имени М.В.Ломоносова»

академик РАН



В.П.Скулачев