

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе **Косовой Анастасии Андреевны**
«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

Репарация – это процесс, обуславливающий сохранение генетической информации всех живых организмов. Социально значимыми являются исследования процессов репарации как в клетках бактерий, встречающихся повсеместно, так и в клетках эукариот. Сбои в работе репарационной машины могут вызывать мутации в генах организма и даже его гибель. Поэтому необходимость изучения процессов, приводящих к исправлению повреждений в клетках, не вызывает сомнения. Одними из наиболее частых повреждений в ДНК являются апуриновые/апиримидиновые участки (AP-сайты), образующиеся в результате гидролиза N-гликозидной связи между остатком дезоксирибозы и гетероциклическим основанием под действием различных факторов. Основной путь репарации AP-сайтов в клетках человека инициирует апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1). Однако при химиотерапевтическом ингибировании действия данного фермента или экспрессии его мутантных форм возможна реализация «запасных» механизмов репарации AP-сайтов, которые могут способствовать устойчивости опухолевых клеток. Работа Косовой А.А. направлена на поиск таких механизмов, идентификацию взаимодействующих с AP-сайтами белков клеток человека и изучение особенностей их функционирования, что расширяет границы наших представлений о клеточных процессах. Поэтому тема диссертации Косовой А.А., безусловно, актуальна.

Диссертационная работа Косовой А.А. является закономерным продолжением масштабных исследований репарационных процессов, проводимых в лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН, возглавляемой проф. О.И. Лаврик. В комплексном исследовании, выполненном диссертантом, впервые показано, что многофункциональный белок Ku может инициировать репарацию AP-сайта в составе определенных структур ДНК, которые можно рассматривать как кластерные повреждения. Впервые установлено взаимодействие глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) с AP-сайтами в составе ДНК. Это открытие, сделанное Косовой А.А., представляет большой интерес, поскольку в нормальных условиях этот гликолитический фермент локализуется в цитоплазме клетки и отсутствует в ядре. Таким образом, научная новизна результатов, полученных диссертантом, не вызывает сомнений.

Практическая значимость работы Косовой А.А. заключается в оптимизации метода идентификации белков, взаимодействующих с AP-сайтами в составе ДНК, а также в демонстрации возможности использования реакции «кросслинкинга» (образования ковалентно связанного ДНК-белкового комплекса) между содержащими AP-сайт ДНК и GAPDH для детекции этого белка в клеточных экстрактах.

Диссертация Косовой А.А. построена традиционно и состоит из трех основных глав. Обзор литературы содержит три раздела. В первом из них описываются свойства фрагментов ДНК, содержащих AP-сайты, и механизмы взаимодействия различных белков с данными повреждениями в составе ДНК. Во втором разделе рассмотрены основная и дополнительные функции Ku-антигена, в частности, проанализированы данные литературы о его взаимодействии с AP-сайтами и роли в эксцизионной репарации оснований. Особый интерес представляет третий раздел обзора, где проведен подробный анализ накопленной за несколько десятилетий весьма противоречивой информации о связывании гликолитического фермента GAPDH с ДНК, содержащими различные повреждения, и ферментами репарации. Следует отметить, что на основе второго и третьего разделов автором подготовлены обзорные статьи, опубликованные в журналах «Молекулярная биология» и «Биохимия».

В главе «Материалы и методы» описано большинство используемых в работе методик. В своих исследованиях Косова А.А. умело сочетала классические биохимические приемы (например, получение экстрактов клеток) с методами биоорганической химии («кросслинкинг»), активно пользовалась инструментальными методами анализа (масс-спектрометрия).

Глава «Результаты» состоит из трех разделов, в которых изложено решение поставленных задач. Первый раздел посвящен идентификации Ku-антигена и GAPDH, второй и третий – детальному анализу взаимодействия данных белков с AP-сайтами в составе различных ДНК-структур с использованием метода «кросслинкинга». Косовой А.А. установлено, что эффективность образования конъюгатов Ku–AP–ДНК зависит от структуры дуплекса (длины выступающих концов, положения AP-сайта и основания напротив него). Обнаружено, что Ku-антиген способен расщеплять AP-сайты в составе дуплекса, имитирующего кластерное повреждение с одноцепочечными участками, и таким образом инициировать альтернативный путь репарации. В работе убедительно доказано отсутствие урацил-ДНК-гликозилазной активности у выделенных из клеточных экстрактов препаратов GAPDH. С помощью элегантного эксперимента, основанного на последовательном фракционировании клеточного экстракта, продемонстрировано, что другие дегидрогеназы, молекулярные массы которых близки к массе GAPDH, в отличие от нее, не взаимодействуют с AP-ДНК. На основе полученных результатов в диссертации сформулированы гипотезы о

новых путях клеточного ответа на возникновение в ДНК AP-сайтов, которые могут реализовываться, когда основной путь репарации AP-сайтов заблокирован – например, при химиотерапии опухолей.

Следует отметить высокое качество иллюстративного материала. Диссертация содержит приложение, где приведены подробные данные по идентификации белков.

К работе имеются следующие замечания.

- 1) Обзор литературы (глава 1) представляет собой три замечательно написанных, но разрозненных раздела, которые следовало бы объединить общим введением и объяснить, почему в них рассматриваются именно белки Ku и GAPDH.
- 2) В главе 2 «Материалы и методы» (раздел 2.2) отсутствует описание методов хроматографии, которые использовались для фракционирования клеточных экстрактов, что делает затруднительным воспроизведение подходов, предлагаемых автором. Также, к сожалению, не указывается, как рассчитывали выход ДНК-белковых конъюгатов, сколько раз проводили эксперименты по «кросслинкингу» и какова их погрешность.
- 3) В главе «Результаты» (стр. 66, рис. 3.1) не объясняется, почему из высокомолекулярных конъюгатов, образующихся при взаимодействии белков клеточных экстрактов с различными содержащими AP-сайт ДНК, интерес для автора представлял именно конъюгат с молекулярной массой около 100 кДа. Возникает вопрос, почему не был проведен анализ конъюгата с массой около 90 кДа, который обнаружен для всех трех типов используемых ДНК, или четко детектируемого высокомолекулярного конъюгата с массой более 100 кДа (рис. 3.1, дорожка 5).
- 4) На мой взгляд, неудачными являются термины «боргидрид-зависимая сшивка» и «боргидрид-независимая сшивка», предложенные автором. Речь идет о визуализации ДНК-белковых конъюгатов, образованных белком и содержащей AP-сайт ДНК, после восстановления боргидридом натрия и в отсутствие восстановления. Формирование устойчивых ДНК-белковых конъюгатов в отсутствие восстановления боргидридом натрия – явление достаточно уникальное. Косова А.А. обнаружила такие ковалентные комплексы, образующиеся при взаимодействии GAPDH, выделенной из клеток HeLa и мышц кролика, с AP-сайт-содержащими ДНК с одноцепочечными участками. В обсуждении этого процесса больше внимания стоило уделить рассмотрению возможных механизмов образования конъюгатов такого типа.

Указанные замечания носят дискуссионный характер и не снижают общей высокой оценки диссертационной работы Косовой А.А. В ней решена задача, имеющая существенное значение для молекулярной биологии и молекулярной онкологии – охарактеризовано взаимодействие многофункциональных белков человека – Ku-антигена и глицеральдегид-3-

фосфатдегидрогеназы – с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами в ДНК. Выводы работы соответствуют полученным результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации.

Методы и подходы, предложенные Косовой А.А., могут быть использованы в лабораториях, где изучаются взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами, а также проводятся работы с клеточными экстрактами, в которых необходимо идентифицировать ДНК- и РНК-узнающие белки, в частности, в Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте биологии гена РАН, Институте белка РАН, ФГУП «ГосНИИгенетика», в центре «Биоинженерия» РАН, на химическом факультете и в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова и в ряде других научно-исследовательских институтов биохимического и молекулярно-биологического профиля.

По актуальности, новизне полученных данных, по своему объему и значимости результатов диссертационная работа Косовой А.А. полностью соответствует требованиям, установленным п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», так как в диссертации содержится решение научной задачи, имеющей существенное значение для повышения эффективности методов терапии онкологических заболеваний. Косова Анастасия Андреевна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
доктор химических наук, профессор

Кубарева Елена Александровна

30.03.2018

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40
тел.: +7(495)939-54-11, e-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

Подпись Кубаревой Е.А. 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