

Отзыв

официального оппонента о диссертационной работе Косовой Анастасии Андреевны «Взаимодействие многофункциональных белков человека — Ки-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

Диссертационная работа Косовой А.А., посвященная поиску ранее неизвестных белков-сенсоров повреждений ДНК, направлена на решение одной из важных проблем современной молекулярной биологии и биохимии – понимание механизмов, обеспечивающих стабильность генома. Постоянное воздействие реакционноспособных внутриклеточных метаболитов и абиотических внешних факторов является источником многообразных повреждений биологических макромолекул, причем одной из значимых мишеней является ДНК. Несвоевременная или ошибочная репарация повреждений в ДНК может вызывать мутации, провоцировать гибель клеток или их злокачественное перерождение. В работе Косовой А.А. глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) и Ки80-субъединица Ки-антигена были идентифицированы как белки, образующие ковалентные комплексы с определенным типом синтетических ДНК, содержащих весьма распространенные в живых клетках повреждения – апуриновые/апиримидиновые (АП) сайты. Интересен сам факт обнаружения ранее неизвестных типов взаимодействий/функций у белков, преимущественно участвующих в других клеточных процессах. ГАФД широко известна как фермент гликолиза, катализирующий превращение D-глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-дифосфоглицерат. Начиная с 1970-х годов, было открыто множество дополнительных функций ГАФД, отличающихся от основной ферментативной активности данного белка. В частности, разными авторами было показано, что ГАФД способна связываться с нуклеиновыми кислотами, перемещаться в ядро, способствуя апоптозу, участвовать в транскрипции и регуляции длины теломер. Более того, показано, что ГАФД способна взаимодействовать с сайтами повреждения ДНК и ферментами, осуществляющими их репарацию. Однако остается неясным, каким образом и при каких условиях данный цитоплазматический белок, который в нативной форме представляет собой тетramer с молекулярной массой около 150 кДа, перемещается в ядро и как различные посттрансляционные модификации влияют на его функции. К белкам, работающим на различные клеточные системы, относится и Ки-антитело, белок, отвечающий за репарацию двухцепочечных разрывов ДНК в клетке. Данная работа является актуальной и практически значимой, поскольку в ней продолжено изучение

дополнительных функций ГАФД и Ки-антитела, которые могут проявляться при воздействии неблагоприятных факторов на клетки и играть роль в формировании клеточного ответа на эти воздействия.

Научная новизна диссертации заключается в использовании оригинального подхода для идентификации белков клеточных экстрактов, взаимодействующих с АП-сайтами в ДНК, в котором АП-сайты играют две роли, будучи одновременно естественными повреждениями ДНК и химически активными группами, обеспечивающими образование ковалентных аддуктов белков с ДНК. Подобный метод идентификации использовался коллегами автора и ранее, однако в данной работе в него была введена дополнительная стадия хроматографического разделения, повышающая его эффективность.

Диссертация объемом 154 страницы построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа содержит 46 рисунков, 4 таблицы, 4 приложения и список литературы из 222 наименований. Во введении четко сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, апробация работы и личный вклад автора.

В обзоре литературы достаточно полно представлена имеющаяся на данный момент информация о свойствах АП-сайтов и функции Ки-антитела и ГАФД, связанной с их взаимодействием с ДНК. Каждая из трех частей представляет собой отдельный мини-обзор, понимание которого доступно даже тому, кто не является специалистом в данной теме, и дающий представление о том или ином «действующем лице» диссертационной работы. Большое количество данных, полученных из множества противоречивых источников (например, функции ГАФД и ее посттрансляционные модификации), осмыслено автором и обобщено в виде схем, значительно упрощающих восприятие этой информации.

В диссертации детально описаны использованные материалы и методы, причем не только те, которые широко распространены в биохимических лабораториях, но и специфичные для этой работы, такие как боргидрид-зависимая сшивка белков с АП-ДНК и идентификация белков, взаимодействующих с АП-ДНК, с помощью масс-спектрометрии. Используя описания экспериментов, приведенные в диссертации, можно успешно воспроизвести их в любой биохимической лаборатории.

Вместе с общепринятыми методами автору пришлось развивать собственные подходы к выделению комплексов белков-мишеней с АП-ДНК, и к наиболее серьезным удачам хочется отнести метод обогащения указанных комплексов из клеточных

экстрактов за счет использования различных методов ионообменной хроматографии; мне кажется этот подход настоящим научным успехом соискателя

После идентификации ГАФД и Ки-антитела как белков, формирующих ковалентные комплексы с АП-сайтами в ДНК, было проведено выделение этих белков из клеток человека и изучено их взаимодействие с АП-сайтами. При этом оказалось, что специфичность взаимодействия Ки-антитела с ДНК АП-сайтов, определяется некоторыми структурными особенностями последних, а сам белок способен расщеплять АП-сайт, обеспечивая возможность протекания альтернативного пути репарации этого повреждения, который не зависит от апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1 – основного фермента клеток высших эукариот, инициирующего репарацию АП-сайтов. Эта часть работы фактически продолжает и углубляет ранее начатые в лаборатории автора исследования. Настоящей «изюминкой» диссертации является впервые полученное доказательство взаимодействия ГАФД с АП-сайтами в ДНК. Можно было бы предположить, что «родственные» ГАФД ферменты со сходной структурой и близкими молекулярными массами, такие как лактат- и малатдегидрогеназа, тоже способны взаимодействовать с АП, однако проведенный автором эксперимент убедительно доказывает, что такое предположение неверно. Автор установила, что ГАФД формирует два типа ковалентных комплексов с АП-сайтами – боргидрид-зависимые (обратимые) и боргидрид-независимые (необратимые), что может объясняться различием аминокислот, образующих продукты с дезоксирибозой АП-сайта. Образование указанных продуктов при сшивке ГАФД с АП-сайтами я считаю важным фактом, поскольку оно обеспечивает действие двух совершенно разных механизмов. Образование обратимых ковалентных комплексов может быть вовлечено в регуляцию репарации АП-сайтов за счет ее временной задержки. Формирование же необратимых комплексов белок-ДНК требует значительно более сложных клеточных процессов, либо репарация этого сложного повреждения полностью блокирована. В частности, образование необратимых комплексов белок-АП-ДНК может являться одним из факторов известной токсичности нерепарированных АП-сайтов. В работе показано, что ГАФД не обладает ферментативными активностями, связанными с репарацией ДНК (АП-лиазной и урацил-ДНК-гликозилазной) и не оказывает значимого влияния на функциональную активность таких важных ферментов репарации ДНК, как PARP1, APE1 и NEIL1. Наличие у ГАФД урацил-ДНК-гликозилазной активности было анонсировано еще в 1991 году группой исследователей, что позволяло в обзораах рассматривать участие этого белка в репарации ДНК. В работе Косовой А.А. эта активность у ГАФД не обнаружена. В литературе есть только еще одно упоминание об отсутствии указанной активности. Таким образом,

полученные Косовой А.А. данные усиливают сомнение в существовании этой функции у ГАФД. Также значимым наблюдением является то, что эффективность взаимодействия ГАФД с АП-сайтами зависит от окислительного состояния данного белка, и АП-ДНК можно использовать в качестве зонда для определения окислительного состояния ГАФД в клеточных экстрактах. В конце работы предложена схема, которая органично объединяет полученные автором результаты с литературными данными, и на основе этого высказывается предположение о том, как показанные *in vitro* свойства ГАФД могут проявляться в клетке в стрессовых условиях.

К достоинствам данной диссертационной работы следует отнести также то, что она написана очень логично, четким и грамотным языком. Недостатков у работы практически нет, однако замечания хотелось бы сделать по поводу изобилия таких выражений, как β -элиминирование, транснитрозилировать, транслезионные полимеразы, высокоошибочные репликативные ДНК-полимеразы, причем в отдельных фразах встречается сразу несколько подобных выражений, от чего становится не по себе. По мере чтения работы начинает пестрить от повсеместного (и возможно неумеренного) употребления слова «аддукт», которым в научной терминологии принято обозначать продукт реакции АВ двух соединений А и В или их комплекс. Почему бы автору не использовать второй термин хотя бы в части диссертации? Непонятно, что скрывается за выражениями «денатурирует на мономеры» и «выделение соответствующих белков в индивидуальном состоянии» (стр 75). Поскольку в целом работа, повторюсь, написана прекрасно и может служить ориентиром для многих диссертаций, указанные замечания ни в коей мере не снижают ни ценности результатов проведенного исследования ни качества работы в целом.

Содержание диссертационной работы полностью отражено в публикациях и автореферате. Выводы диссертации Косовой А.А. являются четкими и обоснованными. Значимость работы и ее признание научным сообществом подтверждаются публикацией ее результатов в виде нескольких статей в известных российских и зарубежных журналах (причем большинство из этих статей уже цитируются в работах других авторов), а также успешным представлением результатов на множество международных конференций. Таким образом, данная диссертационная работа представляет собой законченный научный труд, является актуальной и обладает научной новизной. В ней выявлены факторы, способные модулировать клеточный ответ на повреждение ДНК, и, следовательно, имеющие значение для биомедицинской химии при разработке комбинированных схем воздействия на онкотрансформированные клетки, которые основаны на повреждении ДНК в сочетании с ингибированием reparации ДНК.

Диссертационная работа полностью отвечает требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а ее автор, Косова Анастасия Андреевна, вне всякого сомнения, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Главный научный сотрудник

Лаборатории защитных механизмов клетки

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института цитологии Российской академии наук,

доктор биологических наук

02.04.2018

Маргулис Борис Александрович

194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-т, д. 4

Тел.: 8 (812) 297-37-94

E-mail: margulis@incras.ru

Подпись Б. А. Маргулиса заверяю

Ученый секретарь

МП

