

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу **Науменко Натальи Вильевны**
«Закономерности процесса удаления объемных аддуктов из кластерных повреждений ДНК системой NER млекопитающих»

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия

Актуальность темы диссертации. В диссертационной работе Науменко Н.В. на модельных фрагментах ДНК исследуется процесс узнавания и удаления из ДНК белками системы NER (нуклеотидная эксцизионная репарация) объемных аддуктов, образующихся в результате введения в обе нити ДНК модифицированных нуклеотидных и нуклеотидных звеньев с фотоактивируемыми и флуоресцентными остатками.

ДНК по своей природе нестабильна как из-за спонтанной химической нестабильности, так и из-за модификаций, вызванных экзогенными и/или эндогенными факторами, вызывающими повреждение ДНК. NER - это универсальный путь репарации, способный удалять широкий спектр повреждений, искажающих спираль ДНК, например, таких как объемные аддукты. Это единственный механизм у млекопитающих, выработанный для восстановления повреждений ДНК, вызванных ультрафиолетовым излучением, и для удаления повреждений ДНК, вызванных многими химиотерапевтическими препаратами, используемыми при лечении онкологических заболеваний, что формирует устойчивость к химиотерапии и клиническому исходу лечения.

Изучение процесса узнавания и удаления из ДНК объемных аддуктов, образующих кластеры повреждений, белками системы NER, анализ свойств модельных ДНК, содержащих кластерные повреждения, оценка эффективности первичного узнавания поврежденного участка ДНК комплексом белков XPC-RAD23B, оценка взаимодействия субъединиц XPD и p44 транскрипционного фактора TFIIID, проведенные в данной работе, помогут выявить ингибиторы NER, что необходимо для разработки новых терапевтических средств для повышения эффективности противораковых лекарств, что соответствует актуальным направлениям развития современной науки и технологий.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из трех частей, посвященных изучению свойств ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих нитях ДНК. В этой части определена температура плавления используемых модельных ДНК, средство XPC-RAD23B к ДНК с объемным повреждением в обеих нитях. Показано, что фактор XPC-

RAD23B связывается с более высоким сродством с ДНК, которые содержат кластерное повреждение, по сравнению с ДНК, содержащей одиночное повреждение. В работе показана обратная зависимость между сродством ХРС к ДНК с объемными повреждениями и эффективностью эксцизионной репарации, что кажется логичным: слишком высокое сродство задерживает белок на ДНК и препятствует развитию следующих шагов NER. Авторы предположили, что обратная корреляция между сродством фактора ХРС-RAD23B к ДНК с nFlu/DEG-6...+6 и эффективностью вырезания nFlu связана с изменениями в структуре ДНК-дуплексов, и использовали для этого компьютерное моделирование, которое показало, что на протяжении всей траектории молекулярной динамики сохраняется стэкинг смежных с nFlu азотистых оснований, а двойная спираль ДНК в участке повреждения находится в «схлопнутом» состоянии, фрагмент nFlu взаимодействует с DEG на противоположной стороне нити ДНК. В целом ДНК с nFlu/DEG характеризуется довольно низкой конформационной подвижностью, что может указывать на присутствие в данном дуплексе ДНК области с повышенной жесткостью структуры. В работе показано, что устойчивость к репарации модельного объемного нуклеотидного повреждения (nFlu), расположенного в кластере с аналогом AP-сайта, обусловлена повышением стабильности смежной с nFlu области ДНК, а также возможностью взаимодействия между этими повреждениями, что препятствует формированию специфических комплексов фактора ХРС с ДНК и, в итоге, протеканию процесса NER.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений. Исследование взаимодействия субъединиц XPD и p44 транскрипционного фактора TFIIID с ДНК, содержащей фотоактивируемые модельные повреждения, проводили с помощью методов флуоресцентного титрования и фотоаффинной модификации. В работе показано, что сродство субъединиц XPD-p44 фактора TFIIID из термофильного гриба *Ct* к ДНК, содержащей фотоактивируемые модельные повреждения, коррелирует с эффективностью эксцизии по механизму NER; эффективность эксцизии модифицированных цитидинов системой NER из ДНК коррелирует с эффективностью взаимодействия XPD-p44 с ДНК, содержащей модельные повреждения. В работе получены новые данные о возможном контакте субъединицы p44 TFIIID с поврежденным участком ДНК в процессе верификации, что может послужить предметом дальнейших исследований. Интерпретация полученных автором экспериментальных результатов представляется вполне аргументированной.

Считаю, что диссертационная работа Науменко Натальи Вильевны обладает **научной новизной**, в работе получены результаты, свидетельствующие о достижении поставленной цели и решении заявленных задач. В целом нет сомнений в том, что в диссертации Науменко Н.В. представлены достоверные и обоснованные экспериментальные результаты и выводы.

Содержание диссертации. Диссертационная работа Науменко Н.В. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, используемых материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и выводов и списка цитируемой литературы - 297 ссылок. Литературный обзор написан довольно хорошо, некоторые моменты очень детально.

Глава «Материалы и методы» содержит описание используемых биохимических и молекулярно-биологических методов. В целом методы описаны довольно подробно. Но, к сожалению, не приведена функциональная характеристика NER-компетентного клеточного экстракта из печени домашнего кролика, только концентрация белка. NER-компетентный клеточный экстракт из клеток HeLa вообще идет инкогнито, без названия. Не приведены также данные о чистоте используемых препаратов рекомбинантных белков, их активности.

Результаты исследовательской работы хорошо представлены в научных профильных журналах, а также на российских и международных конференциях.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с требованиями, соответствует содержанию диссертации и дает полное представление об основных положениях работы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационного исследования. Следует отметить, что полученные Науменко Н.В. результаты могут найти применение в научной и практической деятельности: они дополняют сведения о работе системы NER в условиях использования новых объемных повреждений ДНК, расположенных различным образом в нитях, содержат их характеристики, которые могут использоваться при разработке теоретических основ ингибирования белков репарационной системы ДНК, что необходимо для лечения онкологических, нейродегенеративных и возрастных заболеваний.

При чтении диссертационной работы возникли **некоторые замечания:**

- 1-В работе не представлены характеристики (степень очистки, активность) используемых рекомбинантных белков компетентного комплекса XPD и p44, а также компетентного комплекса XPC-HR23B;
- 2-Нет сведений, характеризующих компетентный экстракт из печени кролика.

3-В работе не обсуждается влияние длины используемых олигонуклеотидов на сродство к белкам.

Заключение. Сделанные замечания не умаляют достоинств работы и не влияют на выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнений.

Диссертация Науменко Н.В. является завершенной научно-квалификационной работой, в которой проведен систематический анализ свойств модельных ДНК, содержащих кластерные повреждения и выявлены структурные особенности устойчивости ДНК к репарации.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что работа Науменко Натальи Вильевны полностью соответствует требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представляемых на соискание ученой степени кандидата наук, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор Науменко Наталья Вильевна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия.

Официальный оппонент:

Заведующий сектором молекулярно-генетических механизмов белок-нуклеиновых взаимодействий
«Федерального исследовательского центра
Институт цитологии и генетики» СО РАН
к.б.н., в.н.с.

Савинкова Людмила Кузьминична

Адрес: г. Новосибирск, 630090, пр. Лаврентьева, 10.
Телефон: 3634132
Электронный адрес: savinkl@mail.ru

Подпись Савинковой Людмилы Кузьминичны заверяю:

Ученый секретарь «Федерального исследовательского центра
Институт цитологии и генетики» СО РАН, к.б.н.

Орлова Г.В.

