

## ОТЗЫВ

на диссертационную работу Речкуновой Надежды Ивановны  
«Механизмы репарации объемных и множественных повреждений ДНК»,  
представленную на соискание ученой степени доктора химических наук  
по специальности 1.5.4 – биохимия

**Актуальность исследования.** Повреждения ДНК, вызываемые различными генотоксическими агентами, как внутриклеточными, так и внешними, ведут к нарушениям процессов метаболизма ДНК, и, как следствие, к возникновению мутаций, хромосомных aberrаций, остановке клеточного цикла и клеточной смерти. Неблагоприятным последствиям повреждений ДНК противостоят различные системы репарации ДНК, нарушения в которых могут быть причиной различных заболеваний человека, в том числе онкологических и нейродегенеративных. Актуальность исследований механизмов репарации ДНК и их регуляции, проведенных в диссертационной работе Речкуновой Надежды Ивановны, определяется их важной ролью в поддержании целостности генома, а также необходимостью подавлять репарацию ДНК при использовании в онкотерапии препаратов, направленно повреждающих ДНК, в том числе путем образования объемных ДНК-аддуктов. Выбор в качестве объекта исследования системы эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), удаляющей объемные ДНК-аддукты различной структуры, объясняется важностью этой системы репарации для противостояния многим неблагоприятным факторам окружающей среды. Кроме того, в работе исследована роль в регуляции процесса NER поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемого поли(ADP-рибоза)полимеразой 1 (PARP1) в ответ на повреждение ДНК, а также особенности репарации множественных повреждений, для исправления которых необходимо действие как системы NER, так и эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER).

**Содержание работы.** Большая часть работы посвящена изучению системы NER. С помощью разработанных ранее с участием соискателя подходов, основанных на использовании фотореакционноспособных аналогов ДНК, проведен детальный анализ взаимодействий белковых факторов NER с ДНК и топографии комплексов, формирующихся на разных этапах процесса. В результате было установлено, что на этапе узнавания повреждения белок XPC-RAD23B взаимодействует с неповрежденной цепью ДНК-дуплекса, не контактируя с повреждением. Полученные результаты внесли заметный вклад в установление механизма узнавания повреждения в системе NER и объяснение широкой субстратной специфичности, характерной для этого процесса.

Одним из важных результатов данной работы является установление локализации факторов NER, XPA и RPA, на поврежденной ДНК в так называемом «предрасщепляющем» комплексе, формирующемся на стадии, предшествующей вырезанию поврежденного участка ДНК специфическими эндонуклеазами. В работе впервые выявлены места контактов XPA и RPA с определенными участками структуры в частично открытом ДНК-дуплексе. Интересные закономерности в локализации этих белков выявлены также на ДНК-структурах,

моделирующих интермедиаты более поздних стадий процесса NER. На основании полученных результатов высказано предположение о вероятном вовлечении этих белков или их комплекса в завершающие этапы процесса.

В работе впервые показана модификация субъединиц гетеродимера XPC-RAD23B, катализируемая PARP1 в ответ на повреждение ДНК УФ-облучением. Обнаружено также влияние синтеза поли(АДФ-рибозы) на связывание XPC-RAD23B с ДНК, в том числе за счет конкуренции поли(АДФ-рибозы) с ДНК. Эти результаты позволили предположить, что PAR-илирование XPC-RAD23B играет важную роль в инициации процесса NER. Показано PAR-илирование и других исследованных в работе факторов NER, XPA и RPA. В случае RPA установлено, что этот белок не только является мишенью PAR-илирования, но и влияет на активность PARP1 в зависимости от структуры ДНК-активатора.

В заключительной части диссертационной работы Речкуновой Н.И. проведен детальный анализ закономерностей репарации множественных повреждений ДНК. С использованием ДНК-дуплексов, содержащих апуриновый/апиримидиновый (AP) сайт в одной цепи и объемное повреждение – производное бенз[а]пирена ( $B[a]P-N^2-dG$ ) – в противоположной, исследовано влияние конформации  $B[a]P-N^2-dG$  и взаимного расположения повреждений на активность ферментов BER – AP-эндонуклеазы 1 (APE1) и репарационных ДНК-полимераз  $\beta$  (Pol $\beta$ ),  $\lambda$  (Pol $\lambda$ ) и  $\iota$  (Pol $\iota$ ). Определены оптимальные условия для каждого из ферментов, участвующих в процессинге AP-сайта вблизи объемного повреждения. Показано, что на активность ферментов в репарации AP-сайта в составе кластеров с  $B[a]P-N^2-dG$  влияет в большей степени взаимное расположение повреждений, чем конформация объемного аддукта.

Впервые выявлена способность исследованных ДНК-полимераз вести реакцию синтеза в брешу напротив  $B[a]P-N^2-dG$ . Установлено, что Pol $\lambda$  в любых условиях встраивает только комплементарный нуклеотид исключительно напротив *cis*-изомера, тогда как Pol $\beta$  и Pol $\iota$  обладают меньшей специфичностью и точностью синтеза. Проведенное моделирование комплексов Pol $\lambda$  и Pol $\beta$  с поврежденной ДНК методом симуляции молекулярной динамики позволило выявить структурные особенности, определяющие различие в специфичности этих ферментов в отношении изомеров  $B[a]P-N^2-dG$ .

**Достоверность и обоснованность результатов.** Все представленные в диссертации результаты опубликованы в известных международных и российских изданиях, представлены на многочисленных международных конференциях. Выводы сформулированы на основе полученных результатов и не вызывают сомнений.

**Замечания.** Существенных замечаний к работе нет. На некоторых рисунках присутствует слишком мелкий шрифт (Рис. 25 и 27).

**Заключение.** Диссертационная работа Речкуновой Н.И. является законченным научным исследованием, в которой решена важная научная задача по выяснению механизма репарации объемных и множественных повреждений ДНК. Работы выполнены на высоком научном и методическом уровне, и полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и



фундаментальной медицины СО РАН. Диссертационная работа в виде научного доклада оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Речкунова Надежда Ивановна, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Ведущий научный сотрудник  
кафедры химической энзимологии  
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,  
доктор химических наук

Газарян Ирина Георгиевна

14.09.2022 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», химический факультет

Адрес Москва, 119234, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет МГУ, д.1с11  
Телефон: +7 (495) 939-3200  
Факс: +7 (495) 932-88-46  
Эл. адрес: [gazaryan@enz.chem.msu.ru](mailto:gazaryan@enz.chem.msu.ru)

Подпись Газарян Ирины Георгиевны заверяю

