

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

**Речкуновой Надежды Ивановны**

### **«МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАЦИИ ОБЪЁМНЫХ И МНОЖЕСТВЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК»**

представленную на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

#### Актуальность исследования

Диссертационная работа Речкуновой Н. И. посвящена изучению процессов, участвующих в клеточном ответе на особый класс повреждений ДНК, в которых комбинируются свойства нескольких типов повреждений — объёмных аддуктов, модифицированных и утерянных азотистых оснований и разрывов цепи ДНК.

Проблема репарации множественных повреждений ДНК впервые стала обсуждаться в работах по повреждению ДНК ионизирующими излучениями. Наличие двух близко расположенных одноцепочечных разрывов в противоположных цепях ДНК приводит к двуцепочечному разрыву, который может стать летальным для клетки. При наличии разрыва в одной цепи и повреждённого основания в другой цепи или двух повреждённых оснований в противоположных цепях ДНК нескоординированная репарация повреждений может также вызвать двуцепочечный разрыв. Однако повреждённые основания, индуцированные ионизирующими излучениями, в основном относятся к классу т. н. «небольших неискажающих повреждений», которые не вызывают заметных конформационных изменений в канонической структуре В-ДНК. Такие повреждения в основном исправляются системой эксцизионной репарации оснований ДНК (в литературе, в том числе отечественной, для неё принято сокращение BER, от англ. Base Excision Repair). В противоположность этому, «объёмные аддукты» преимущественно образуются при реакции ДНК с

активированными электрофильными ксенобиотиками, сильно искажают структуру ДНК и удаляются системой эксцизионной репарации нуклеотидов (NER, от англ. Nucleotide Excision Repair), в которой задействованы другие белки, чем в пути BER. До сих пор репарация множественных повреждений, в которых одно из индивидуальных повреждений представляет собой объёмный аддукт, остаётся слабо исследованной. В связи с этим рассматриваемая работа отличается большой актуальностью.

В диссертационной работе Речкуновой Н. И. применён методологически новый подход, основанный на использовании пиримидиновых нуклеотидов, несущих объёмный фотореакционноспособный заместитель, как повреждений, узнаваемых системой NER. Помимо них, использовались и более традиционные фотореакционноспособные аналоги. В сумме это позволило диссертанту определить общую архитектуру комплекса белков XPC и RAD23B человека — первичного сенсора повреждений — с повреждённой ДНК. Были исследованы другие привлекаемые к этому первичному комплексу ключевые белки репарации — XPA, RPA и PARP1. Наконец, с использованием традиционного модельного объёмного повреждения — аддукта гуанина с бенз[*a*]пирен-7,8-дигидродиол-9,10-эпоксидом (BPDE) — было изучено функциональное взаимодействие систем BER и NER в процессе репарации множественных повреждений.

### Структура и содержание работы

Диссертационная работа Речкуновой Н. И. представлена в виде научного доклада и сопровождающего его автореферата. В связи с этим обзор литературы и подробное описание экспериментальных методов как таковые в диссертации отсутствуют; экспериментальные методы на должном уровне описаны в публикациях соискателя по теме диссертации. Автореферат хорошо структурирован и состоит из общей характеристики работы, описания содержания работы, заключения, выводов и списка

публикаций. Автореферат изложен на 45 страницах, проиллюстрирован 28 рисунками, содержит 7 таблиц.

В первой части диссертант обосновывает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, суммирует научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, определяет положения, выносимые на защиту, описывает свой личный вклад в выполнение работы и указывает мероприятия, на которых были апробированы её основные результаты.

Собственно описание работы разделено на 6 частей. В первой из них доказываются субстратные свойства фотореакционноспособных аналогов пиримидиновых нуклеотидов, несущие объёмные арилазидные группы. Разрабатывается метод синтеза плазмидных ДНК-субстратов с такими модифицированными нуклеотидами и анализа продуктов их расщепления в NER-компетентных клеточных экстрактах. На основе полученных результатов диссертант делает вывод, что использованные фотореакционноспособные производные, несмотря на несколько менее предпочтительные субстратные свойства по сравнению с традиционными модельными объёмными повреждениями, могут быть использованы для изучения структуры и механизма функционирования системы NER.

Вторая часть работы посвящена применению описанных выше фотореакционноспособных нуклеотидов для анализа структуры комплекса ХРС–RAD23В–ДНК. Поскольку строение этого комплекса пока не удаётся определить методами рентгеноструктурного анализа или криоэлектронной микроскопии (получена только структура Rad4p — дрожжевого гомолога ХРС), подходы, основанные на фотохимических реакциях, имеют высокую ценность для установления общей архитектуры комплекса. Диссертант показывает эффективную фотосшивку ДНК-субстрата с субъединицей ХРС комплекса, которая облегчается при частичной дестабилизации двуцепочечной ДНК введением в дуплекс некоплементарных участков, что, по всей вероятности, отражает важность вызванной повреждением

дестабилизации ДНК для узнавания комплексом ХРС–RAD23В. Затрагивая тематику множественных повреждений, в этой части работы диссертант также показывает, что введение в противоположную цепь ДНК антраценового производного цитозина, которое очень эффективно узнается системой NER, приводит к снижению модификации ХРС за счёт переориентации белкового комплекса на ДНК.

В третьей части диссертации исследование комплекса ХРС–RAD23В–ДНК развивается с привлечением набора субстратов, содержащих в дополнение к арилазидным производным пиримидинов и другие фотореакционноспособные группировки, в данном случае 5-иодурацил (5-IU). Такой подход позволил определить преимущественные точки сшивки на близком расстоянии и показать, что большая часть контактов ХРС с ДНК приходится на цепь, комплементарную повреждённой. Помимо ХРС/RAD23В человека, диссертантом также проведено исследование в той же олигонуклеотидной системе гомологичных белков из дрожжей — Rad4 и Rad23, для которых установлена пространственная структура. Данные фотосшивки в целом совпали с данными рентгеноструктурного анализа, что служит сильным аргументом в пользу того, что и для человеческого белка полученные данные правильно отражают архитектуру комплекса. Также в этой части работы сделана попытка провести корреляцию между эффективностью связывания ХРС и степенью изгиба ДНК, индуцируемого повреждением.

Следующая часть работы посвящена изучению взаимодействия белков ХРА и РРА с ДНК-интермедиатами, возникающими в пути NER. Оба они связываются с NER-комплексом после ХРС, но общая архитектура белок-белковых и белок-нуклеиновых взаимодействий остаётся неизвестной. С помощью тех же методов фотосшивки диссертант показывает, что белок ХРА связывается с 5'-стороны от повреждения с границей дестабилизированного «пузыря» в составе ДНК-дуплекса, а неповреждённая цепь стабилизируется в одноцепочечном состоянии, образуя комплексы

переменной стехиометрии с гетеротримерами RPA. Далее исследованы взаимодействия XPA и RPA с олигонуклеотидами, моделирующими стадии NER после гидролиза ДНК с 5'-стороны от повреждения, что позволило диссертанту предложить модель синтеза ДНК в брешах на постинцизионной стадии NER.

В пятой части диссертации рассматривается взаимодействие поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 (PARP1) — одного из ключевых регуляторов многих путей репарации — с белками системы NER. Показано, что PARP1 способен связываться с комплексом XPC–RAD23B–ДНК и ковалентно модифицировать обе белковые субъединицы комплекса цепями поли(ADP-рибозы) (PAR), однако не модифицирует свободные белки. С другой стороны, сам комплекс связывает цепи PAR. Белок RPA в экспериментах также подвергался PAR-илированию, но, что даже более интересно, был способен модулировать активность PARP1 за счёт регуляции доступности разных типов локальной структуры ДНК, с которыми гетеротример RPA связывается в разных конформациях.

Последняя часть работы затрагивает репарацию множественных кластерных повреждений, в которых объёмные аддукты соседствуют с другими типами повреждений ДНК. Здесь в качестве объекта исследований выступают более традиционные объёмные повреждения — аддукты dG-VPDE, а в качестве второго повреждения взят апурин-апириимидиновый сайт (АП-сайт), который обычно репарируется по пути BER. В работе показано, что при определённом расположении АП-сайтов относительно аддукта их гидролиз АП-эндонуклеазой APE1 затруднён. Объёмный аддукт также затруднял следующий этап репарации — включение неповреждённого dNMP ДНК-полимеразами, снижал точность этих ферментов и изменял их предпочтения к дивалентным катионам. Для объяснения наблюдаемых эффектов было проведено структурное моделирование комплексов APE1 и ДНК-полимеразы  $\lambda$  с ДНК. Однако комплекс APE1 и ДНК-полимеразы  $\beta$

обладал более высокой эффективностью и точностью при наличии dG-BPDE в матричной цепи ДНК.

В целом поставленные в работе задачи решены, выносимые на защиту положения аргументированы. Диссертантом проведена впечатляющая по масштабу работа, результаты которой должным образом опубликованы и отражены в научном докладе и автореферате.

#### Замечания по диссертационной работе

Замечания, которые можно сделать, немногочисленны и в основном вызваны формой представления в виде научного доклада, неизбежно менее детального, чем диссертационная работа традиционного вида.

- 1) Фотохимия реакций сшивки с боковыми радикалами аминокислот достаточно хорошо изучена как минимум для 5-IU. Очевидно, что сшивка проходит с разной эффективностью для разных аминокислотных остатков, и наблюдаемые различия в экспериментах с 5-IU-субстратами, скорее всего, отражают не только глобальную архитектуру ДНК-белкового комплекса, но и наличие поблизости реакционноспособных аминокислотных остатков, в основном, тирозина. Как минимум для части работы, выполненной на дрожжевом белке, для которого известна пространственная структура в комплексе с ДНК, хотелось бы видеть анализ зависимости эффективности сшивки от аминокислотного окружения, более детальный, чем констатация высокого выхода при «связывании [нуклеотида напротив повреждения] в гидрофобном кармане белка».
- 2) Представляется не вполне корректным проводить корреляции между изгибом ДНК и сродством ХРС к ней на основании только 4 типов олигонуклеотидных субстратов (табл. 4 и связанная с ней часть текста). Некоторые повреждения вполне эффективно узнаются системой NER (циклобутановые пиримидиновые димеры, псораленовые моноаддукты), но при этом, по данным спектроскопии ЯМР, не

вызывают заметного изгиба ДНК. Напротив, разрывы и бреши в ДНК вызывают её изгиб, но не узнаются ХРС. В данном случае было бы корректнее провести анализ литературных данных об угле изгиба разных повреждённых ДНК и сродством ХРС к таким повреждениям, и делать выводы на более обширном материале.

- 3) При анализе связывания RPA со структурами, содержащими одноцепочечную ДНК (рис. 13), не вполне понятно, на каком основании отдельные полосы на электрофореграммах соотнесены с комплексами с разной стехиометрией. Так, на рис. 13а и 13в с повышением концентрации RPA начинают накапливаться полосы с подвижностью как выше, так и ниже той, которая соответствует двум молекулам RPA на молекулу ДНК. На рис. 13в в эксперименте с брешью длиной 10 нт можно насчитать как минимум 5 полос, возможная стехиометрия которых никак не прокомментирована.
- 4) Часть, посвящённая репарации кластерных повреждений, в которых объёмные аддукты соседствуют с АП-сайтами, значительно выиграла бы, если бы была сделана попытка оценки уровня таких повреждений. В тексте утверждается, что искажение двойной спирали ДНК, вызываемое объёмным аддуктом, может усилить спонтанный гидролиз гликозидных связей. Однако с учётом того, что уровень большинства объёмных аддуктов имеет порядок  $\sim 1$  на  $10^7$ – $10^8$  нуклеотидов, а константа скорости спонтанного гидролиза *N*-гликозидной связи в одноцепочечной ДНК при  $37^\circ$  и физиологических значениях pH даже в менее стойких пуриновых нуклеотидах составляет около  $2 \times 10^{-10} \text{ с}^{-1}$ , вероятность образования такого множественного повреждения представляется очень малой.
- 5) Имеются определённые погрешности в оформлении списка публикаций по теме диссертации: у статей в зарубежных журналах отсутствуют указания на номер выпуска, не у всех работ указан идентификатор DOI (даже там, где он есть).

### Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов

Представленные в работе результаты свидетельствуют о том, что научные положения и выводы полностью обоснованы и достоверны. Необходимая статистическая обработка проведена. Выводы работы лежат в рамках современного понимания процессов координации репарации множественных повреждений ДНК. Материалы диссертационной работы отражены в 33 публикациях, все из которых представляют собой статьи в рецензируемых изданиях (15 в российских и 18 в международных научных журналах), включённых в международные системы цитирования Web of Science и Scopus.

### Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Работа выполнена в очень актуальной области, связанной с поиском механизмов защиты генома человека от мутаций, а на уровне всего организма — от онкогенеза. Исследования диссертанта за время с 2004 г., охваченное представленными публикациями, внесли значительный вклад в формирование современных научных представлений о процессе эксцизионной репарации нуклеотидов. Получены многочисленные данные о пространственной организации комплексов NER, что даёт основу для поиска способов регуляции репарации в терапевтических целях.

### Общее заключение

Сделанные замечания по содержанию и оформлению работы не умаляют её достоинств и не влияют на выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям научного доклада и опубликованных автором работ по теме диссертации.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа Речкуновой Надежды Ивановны «Механизмы репарации объёмных и



множественных повреждений ДНК» является цельным завершённым научным исследованием, полностью соответствует требованиям, установленным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание учёной степени доктора наук. 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 заслуживает присуждения искомой учёной степени доктора химических наук по специальности 1.4.5 – биохимия.

Заведующий лабораторией белковой инженерии  
Федерального государственного автономного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет», доктор  
биологических наук, доцент, профессор РАН, член-  
корреспондент РАН

Жарков Дмитрий Олегович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ)

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Телефон: (383) 363-40-00

Факс: (383) 363-42-80

Эл. адрес: rector@nsu.ru

Подпись Жаркова Д. О. удостоверяю

15 сентября 2022 г.

