

ОТЗЫВ

официального оппонента 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 темы исследования

Репарация ДНК относится к числу ключевых процессов, обеспечивающих генетическую стабильность любой живой клетки. Исследование систем репарации ДНК и их регуляции актуально как с точки зрения понимания фундаментальных механизмов сохранения генетической информации, так и для поиска новых путей лечения заболеваний человека, в том числе онкологических. От эффективности работы систем репарации ДНК зависит способность организма противостоять неблагоприятным факторам окружающей среды, старению и болезням. С другой стороны, системы репарации необходимо подавлять при использовании в онкотерапии препаратов, направленно повреждающих ДНК. Важное место среди систем репарации, снижающих терапевтический эффект таких воздействий, занимает эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER). Именно эта система, обладающая широкой субстратной специфичностью, ответственна за удаление объемных ДНК-аддуктов, возникающих в результате применения химиотерапевтических средств. Активность систем репарации ДНК зависит также от регуляторных факторов, к числу которых относятся посттрансляционные модификации белков, участвующих в процессах репарации, в частности, поли(ADP-рибозил)ирование, катализируемое поли(ADP-рибоза)полимеразой 1 (PARP1) в ответ на повреждение ДНК. Наибольшую угрозу для стабильности генома представляют множественные (кластерного типа) повреждения, требующие координированного действия разных систем репарации. Например, для репарации кластеров, содержащих окислительные и объемные повреждения ДНК, необходимо действие систем эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER) и NER. В диссертационной работе Речкуновой Н.И. проведено масштабное исследование, охватывающее анализ всех аспектов функционирования системы NER – от механизма узнавания повреждений до влияния поли(ADP-рибозил)ирования белков на их взаимодействие с ДНК, а также анализ влияния объемных повреждений ДНК на активность ферментов BER. В связи с этим, актуальность работы не вызывает сомнения.

Структура и содержание работы

Диссертация Речкуновой Н. И. в виде научного доклада представлена в формате 44 страничной брошюры, включающей вводную часть («Общая характеристика работы»), основной раздел «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список публикаций по теме диссертации». Работа содержит 28 рисунков и 7 таблиц.

Во вводной части автор обосновывает актуальность темы исследования, определяет состояние знаний в исследуемой области на момент начала работы, формулирует цель и задачи своей работы, новизну и значимость полученных результатов, выносимые на защиту положения. Далее следует информация о презентации результатов на международных конференциях и в печатных изданиях, о личном вкладе автора в исследование.

Результаты работы и их обсуждение разделены на шесть глав. Первые четыре главы посвящены изучению системы NER и представляют собой логически выстроенное исследование, направленное на характеристику взаимодействия основных белков NER, протекающей по пути общегеномной репарации. В первой главе автором показано, что фотоактивируемые арилазидопроизводные нуклеотидов могут выступать в качестве повреждений, узнаваемых и удаляемых по механизму NER. Далее (глава 2) такие аналоги, были использованы для анализа взаимодействия с поврежденной ДНК белка XPC-RAD23B (белок пигментной ксеродермы С в комплексе с гомологом дрожжевого белка Rad23) – наиболее вероятного кандидата на роль фактора, первым узнающего повреждение. На момент проведения этих исследований механизм, обеспечивающий универсальность системы NER, был непонятен. Полученные в работе результаты, наглядно продемонстрировавшие необходимость неповрежденного участка ДНК напротив повреждения для продуктивного взаимодействия XPC-RAD23B с ДНК, а затем и прямые контакты этого белка с неповрежденной цепью ДНК-дуплекса, внесли заметный вклад в установление механизма узнавания повреждения в системе NER.

Для более точной локализации XPC-RAD23B на поврежденной ДНК были проведены эксперименты по ковалентному связыванию белка набором ДНК-дуплексов, содержащих остаток фотоактивируемого 5-йод-2'-дезоксиридина в определенном положении цепи («фотоаффинный футпринтинг», обеспечивающий «сшивку нулевой длины»). Они описаны в главе 3. Сравнительный анализ расположения на поврежденной ДНК факторов первичного узнавания повреждения в системе NER человека и дрожжей, для которого в независимом исследовании была решена структура комплекса с ДНК, выявил общие закономерности формирования комплексов этих белков на поврежденной ДНК. Таким образом, полученные разными методами данные свидетельствуют в пользу эволюционной консервативности структурной организации факторов, «сканирующих» ДНК на наличие повреждения.

Значительным достижением представленной работы является установление топографии комплекса, формируемого на стадии, предшествующей вырезанию поврежденного участка ДНК специфическими ферментами NER (глава 4). Впервые показано, что репликативный белок А (RPA) и белок пигментной ксеродермы А (ХРА) специфически взаимодействуют с определенными участками частично расплетенного ДНК-дуплекса: ХРА располагается в месте

перехода одноцепочечной ДНК в дуплекс, а основным местом контакта RPA является участок неповрежденной цепи напротив повреждения. Такое расположение обеспечивает необходимую локализацию структурно-специфичных эндонуклеаз, действующих на следующем этапе NER, и защиту неповрежденной цепи ДНК от расщепления. Эти данные опубликованы в высокорейтинговом журнале *Nucleic Acids Research*. Дальнейшее исследование взаимодействия XPA, RPA и их комплекса с ДНК-структурами, моделирующими интермедиаты различных этапов процесса NER, выявило интересные закономерности в формировании контактов этих белков с ДНК. На основании совокупности данных предложена модель, демонстрирующая локализацию факторов NER на ДНК-интермедиате, формирующемся после расщепления поврежденной цепи эндонуклеазой XPF-ERCC1.

Представленная работа вносит значительный вклад и в установлении роли одной из ключевых посттрансляционных модификаций белков – поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемого PARP1, в регуляции процесса NER (глава 5). Речкуновой Н.И. впервые показана прямая зависимость реакции ковалентного присоединения к белкам полимера ADP-рибозы (PAR), катализируемой PARP1, от наличия в ДНК УФ-индуцированных повреждений, репарируемых системой NER. На основании полученных данных выдвинуто предположение о роли PAR-илирования XPC-RAD23B в инициации процесса NER. Установлено PAR-илирование белка RPA и впервые обнаружено его влияние на активность PARP1. Показано, что в присутствии одноцепочечной ДНК RPA практически полностью ингибирует синтез PAR, в то время как в присутствии ДНК-дуплекса, содержащего разрыв или брешь, наблюдается значительная стимуляция синтеза PAR.

Заключительная шестая глава диссертации посвящена изучению особенностей исправления повреждений кластерного типа. В качестве модели такого типа повреждений в работе рассматриваются ДНК-дуплексы, содержащие апуриновый/апиримидиновый (AP) участок в одной цепи и объемное повреждение – производное бенз[*a*]пирена (BPDE) – в противоположной. Установлено, что активность ферментов BER в репарации AP-сайтов в составе кластеров с BPDE-dG в большей степени зависит от взаимного расположения повреждений, чем от конформации объемного аддукта. Так, в зависимости от положения AP-сайта относительно объемного заместителя наблюдалось снижение активности AP-эндонуклеазы 1 (APE1) в пределах двух порядков. Впервые обнаружена абсолютная специфичность ДНК-полимеразы λ (Pol λ) при заполнении бреши напротив *цис*-изомера BPDE-dG, тогда как другой фермент того же структурного семейства, ДНК-полимераза β (Pol β), способен «проходить» оба изомера, хотя и с меньшей точностью. Показано, что эффективность и точность синтеза ДНК в бреши на поврежденной матрице, катализируемого Pol β , увеличивается за счет взаимодействия с эндонуклеазой APE1. Проведенное моделирование по

методу симуляции молекулярной динамики позволило выявить структурные особенности комплексов Pol α и Pol β с поврежденной ДНК, обуславливающие различия в специфичности этих ферментов в отношении изомеров BPDE-dG. Следует отметить, что по результатам исследований репарации кластеров опубликованы 4 статьи в журнале DNA Repair – профильном журнале по репарации ДНК.

В заключении автор суммирует полученные результаты, обозначает их научную значимость, а также определяет потенциал их дальнейшего использования и возможные направления развития исследований.

Таким образом, автором получены новые фундаментальные знания, расширяющие наши представления о путях репарации объемных повреждений в ДНК. Следует отметить большое количество методов и подходов биоорганической химии и молекулярной биологии, использованных Речкуновой Н.И. для решения поставленных задач. Выполнение исследования сопровождалось разработкой новых методик и оптимизацией традиционных подходов. Особенно хочу подчеркнуть филигранные эксперименты, касающиеся «фотохимического футпринтинга», выполнение которых требует чрезвычайно высокой квалификации исследователя.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность представленных в диссертации результатов не вызывает сомнений. Выводы обоснованы и полностью вытекают из представленных данных. Основные результаты работы опубликованы в авторитетных международных изданиях, в числе которых Nucleic Acids Research, Journal of Biological Chemistry, DNA Repair, Biochemistry и ряд других. Всего по материалам исследования опубликовано 33 статьи в различных международных (18) и российских (15) изданиях. Признанием вклада соискателя в исследуемую область является участие во многих престижных международных конференциях по профилю работы, в том числе в конференциях «Responses to DNA damage: from molecular mechanism to human disease» и конференциях европейского общества экологического мутагенеза и геномики (EEMGS). Работа выполнена в Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН под руководством академика РАН Ольги Ивановны Лаврик – ведущего российского ученого в области исследования репарации ДНК, работы которой получили широкое международное признание.

Замечания

1. Основное замечание касается последней части работы, связанной с изучением репарации кластерных повреждений. Эта часть выглядит обособленной в данной работе, так как в ней рассматривается функционирование эндонуклеазы APE1 – белка из совсем другой системы репарации – эксцизионной репарации оснований, а также репарационный синтез ДНК-

полимеразами β , λ и ι . В этой части хотелось бы увидеть характеристику взаимодействия комплекса ХРС-RAD23В с ДНК, содержащими *цис*- и *транс*-изомеры ВРDЕ-dG. Связать представленный материал с предыдущими частями позволили бы также данные о влиянии белковых факторов системы NER, в особенности фактора первичного узнавания повреждения ХРС-RAD23В, на эффективность исправления АР-сайтов эндонуклеазой АРЕ1, а также на активность и специфичность рассматриваемых ДНК-полимераз. Не выполняя дополнительных экспериментов, следовало хотя бы обобщить полученные данные в виде схем, указывающих какие субстраты NER с бенз[α]пиреном могут существовать после попытки репарации системой ВЕР АР-участка, локализованного в разных положениях относительно объемного повреждения.

2. Для целостного восприятия работы системы NER на начальных этапах не хватает модели взаимодействия исследуемого в работе комплекса ХРС-RAD23В с белками ХРА и RPA на поврежденной ДНК, пусть и предложенной на основе данных других научных групп.

3. Также несколько отвлеченным от общей линии работы является раздел 5.3. о влиянии репликативного белка А на функционирование белка PARP1 в зависимости от структуры ДНК. В конце раздела хотелось бы видеть гипотезу, как эта взаимосвязь может влиять на работу системы NER.

4. Из экспериментальных данных есть вопросы к таблице 4. Не указана длина изучаемых ДНК-систем. Погрешность определения констант диссоциации для комплексов белков ХРС-RAD23В и Rad4-Rad23 с ДНК близка к 50%. В связи с этим сродство указанных белковых комплексов к поврежденной ДНК, содержащей остаток dU с флуоресцеином, и ДНК с «пузырем» следует считать сравнимым.

5. Имеется замечание к оформлению диссертации. Оно заключается в необходимости сопровождать описание экспериментальных данных ссылкой на список публикаций по теме диссертации. Невозможность отразить в диссертации, представленной в виде научного доклада, все нюансы работы часто вызывает потребность обратиться к оригинальной статье (в частности, это касается результатов «ферментативного пробинга»; также, например, рис. ба получился в диссертации нечетким и на нем не видны дополнительные зоны, которые обсуждаются в тексте).

Сделанные замечания носят дискуссионный характер и нисколько не умаляют масштабность выполненного исследования и значимость полученных результатов.

Заключение

В заключение следует подчеркнуть высокий научный уровень выполнения работы, количество и качество опубликованных статей по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, а также уровень представления результатов на международных научных мероприятиях. Представленное Речкуновой Н. И. научное исследование вносит существенный

вклад в детальную биохимическую характеристику молекулярных комплексов, формирующихся на начальных этапах функционирования системы эксцизионной репарации нуклеотидов. Полученные автором результаты могут быть использованы для развития работ в этой области в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки: Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте биологии гена РАН, МГУ имени М.В. Ломоносова, НИЦ «Курчатовский институт» и в ряде других научно-исследовательских институтов биохимического и молекулярно-биологического профиля.

Диссертационная работа Речкуновой Н.И. представляет законченное научное исследование и по своему содержанию, уровню проведенных исследований, актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости 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. Автор работы, Речкунова Надежда Ивановна, несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4 – 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

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

Подпись Кубаревой Е.А. удостоверяю.

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

«9» сентября 2022 г.