

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Юдкиной Анны Владимировны «Взаимодействие ДНК-полимераз с блокирующими повреждениями ДНК различных классов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Механизмы, обеспечивающие стабильность существования и воспроизведения генома, остаются одной из центральных проблем современной биологии. Несмотря на интенсивное развитие научной мысли в этой области, возникают все новые и новые вопросы. Как известно, стабильность информации ДНК зависит, в первую очередь, от способности репликативного аппарата, в частности ДНК-полимераз, точно воспроизводить и сохранять генетическую информацию. Возникновение повреждений в ДНК, с одной стороны, является побочным продуктом нормальной жизнедеятельности клетки. С другой, направленное воздействие на клетку, приводящее к повреждению ДНК, широко используется при терапии онкологических заболеваний. Таким образом, способность ДНК-полимераз воспроизводить генетическую информацию с использованием поврежденных матриц представляет собой не только фундаментальный, но и практический интерес. Повреждения могут быть самыми разнообразными, от спонтанно возникающих апуриновых/апиримидиновых сайтов до аддуктов ДНК с органическими или неорганическими молекулами различной природы, поэтому клетка должна иметь в своем арсенале набор подходов и механизмов для исправления всех этих повреждений и сохранения целостности своего генома. На сегодняшний день в литературе неплохо описано взаимодействие различных ДНК-полимераз с ДНК-субстратами, содержащими аддукты гетероциклических оснований с различными молекулами небелковой природы. Между тем существует большое количество экспериментальных свидетельств формирования прочных долгоживущих нековалентных комплексов ДНК и белков или ДНК-белковых сшивок, а о механизмах их репарации и взаимодействия с ними репликативных ДНК-полимераз известно крайне мало. Учитывая все возрастающий интерес к использованию ДНК-повреждающих агентов неорганической природы в качестве лекарственных препаратов при химиотерапии, актуальным также остается изучение спектра продуктов действия таких соединений и механизмов взаимодействия с ними репликативного/репаративного аппарата клетки. Таким образом, основная цель представленной диссертационной работы, заключающаяся в исследовании возможности прохождения ДНК-полимеразами различных типов повреждений, представляется весьма актуальной.

Диссертационная работа Юджиной Анны Владимировны изложена на 139 страницах, содержит 51 рисунок, 8 таблиц, список цитированной литературы включает 365 источников. Текст оформлен в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка цитированной литературы.

Введение описывает актуальность решаемой научной работы, ее цели и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию исследования, а также личный вклад соискателя.

Обзор литературы разбит на две смысловые части, касающиеся описания различных типов блокирующих повреждений ДНК и, собственно, типов ДНК-полимераз. В этих частях представлен достаточно полный обзор опубликованных к сегодняшнему дню работ, касающихся деталей механизмов образования повреждений ДНК различного рода, а также суммированы знания о возможности прохождения этих повреждений ДНК-синтезирующими ферментами. Последняя часть обзора литературы представляет собой непосредственное введение в тему диссертации. В целом литературный обзор дает представление о научной проблеме, поставленные задачи кажутся продуманными и обоснованными.

Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание современных биохимических и физико-химических методов, использованных в работе.

При описании полученных результатов автор придерживается порядка поставленных в работе задач и последовательно изучает взаимодействие ДНК-полимераз различных семейств с ДНК-белковыми сшивками, нековалентными прочными ДНК-белковыми комплексами, а также активность ДНК-синтезирующих ферментов в присутствии полиоксониобата платины и с использованием матрицы, содержащей аддукт АП-сайта с метоксиамином. На основании полученных данных автором была предложена модель взаимодействия ДНК-полимераз с объемными повреждениями белковой природы, которая названа «kiss-and-push», описывающая взаимодействие в терминах соприкосновения поверхностей белковых глобул. Предполагается, что эта модель может быть экстраполирована на взаимодействие ДНК-полимераз с другими типами повреждений ДНК, например, аддуктами полиоксометаллатов, или на взаимодействие других ДНК-связывающих белков, движущихся вдоль контура нуклеиновой кислоты. Интерпретация результатов, предложенная автором, логична и аргументирована, выводы обоснованы и соответствуют полученным результатам.

Основные результаты работы опубликованы в виде 4 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, а также представлены на 5 российских и международных конференциях.

Содержание автореферата соответствует основным положениям, выносимым на защиту.

Несмотря на большой объем результатов и несомненные достоинства работы, при прочтении диссертации возник ряд замечаний, часть из которых носит технический характер.

В частности, литературный обзор лишен названия.

На стр. 42 в разделе 2.2. говорится о том, что только одна работа посвящена взаимодействию геликаз с ДНК-белковыми сшивками, однако раздел 2.1.4.8. описывает различные варианты прохождения подобных препятствий репликативным аппаратом про- и эукариотических клеток, в том числе с участием ДНК-гликозилаз.

На автографах некоторых гелей, например, на рис. 20, стр. 65, наблюдается формирование продукта полимеразной реакции с длиной, значительно превышающей длину матричной цепи, однако объяснения подобному феномену в тексте не приведено.

На некоторых фореграммах, например, на рис. 21 и 22, стр. 68 и 70, соответственно, представлены результаты аналогичных экспериментов, демонстрирующих, однако, разную ферментативную активность, но причины таких различий не объясняются.

Чем объясняется значительное увеличение эффективности реакции расщепления вторичного субстрата ферментом OGG1 в контрольных экспериментах, т.е. в отсутствие первичного субстрата (сравн. начальные уровни расщепления субстрата, представленные на панелях А и Б рис. 30, стр. 82)? Проявляют ли ДНК-гликозилазы различную аффинность по отношению к повреждению, расположенному внутри частичного или полного ДНК-дуплекса?

Данные, представленные на рис. 33, стр. 85, хорошо иллюстрируют механизм расщепления ферментом OGG1 радиоактивно меченого ДНК-субстрата в присутствии ДНК-полимераз, однако не позволяют провести сравнительный анализ эффективности реакции в зависимости от механизма взаимодействия ДНК-полимеразы с ДНК. Возможно, графическое представление эффективности реакции расщепления облегчило бы интерпретацию результатов эксперимента.

Безусловно, характерное время полураспада комплекса Cas9 с ДНК-субстратом (43-91 часов) делает его очень привлекательной моделью для изучения последствий долгоживущих ДНК-белковых комплексов *in vitro*. А есть ли какие-нибудь данные относительно времени жизни такого или аналогичного комплекса *in vivo*? Какие факторы важны для диссоциации комплекса?

После прочтения текста диссертации осталось несколько вопросов, касающихся части, описывающей работу с соединениями платины. Так, на стр. 95 говорится об эквимольном соотношении ДНК и белковых компонентов в условиях реакции с Pt-ПОН. Однако на рис. 41, стр. 96, приведены данные типичного эксперимента с использованием соотношения 10:1. Что подразумевает выражение «эквимольное соотношение»? Из обсуждения полученных данных остается неясным, образуется ли ковалентный комплекс между Pt-ПОН и белком. Также остается неясной эффективность процесса формирования аддукта Pt-ПОН с ДНК и природа

аддукта, представленного на рис. 41А, стр.96, - возможно ли в данном случае формирование ковалентного тройного комплекса белок/Pt-ПОН/ДНК.

В работе имеются некоторые орфографические ошибки, неудачные выражения и стилистические неточности, что не снижает общей ее ценности и не влияет на окончательную оценку.

Подводя итог, без сомнения можно сказать, что результаты представленной работы являются важным шагом в изучении проблемы взаимодействия ДНК-полимераз с различными видами блокирующих повреждений ДНК разного размера и разной химической природы. Экспериментальные данные представляют значительную ценность для биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии и смежных наук.

Таким образом, диссертационная работа Юдкиной Анны Владимировны «Взаимодействие ДНК-полимераз с блокирующими повреждениями ДНК различных классов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, является законченной и соответствует всем требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте Химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Диссертация оформлена в соответствии с приложениями №5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а ее автор Юдкина Анна Владимировна, безусловно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Белоусова Екатерина Анатольевна,

к.х.н., с.н.с. лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), 630090 г. Новосибирск, пр-т академика Лаврентьевна, д. 8. Тел.: +7 (383) 363-51-96, e-mail: rina@niboch.nsc.ru;

27 августа 2020 г

Подпись Белоусовой Е.А. заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.х.н.



Пестряков П.Е.