

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата
биологических наук Юдкиной Анны Владимировны на тему: «Взаимодействие
ДНК-полимераз с блокирующими повреждениями ДНК разных классов», по
специальности 03.01.04 - биохимия

Диссертационная работа Юдкиной А.В. посвящена изучению механизмов действия блокирующих повреждений ДНК на активность ДНК-полимераз разных классов. Высокая актуальность этих исследований определяется тем, что повреждения ДНК играют ключевую роль в мутагенезе и стабильности генома, нарушая процессы репликации и целостность ДНК в клетке. Различные типы повреждений ДНК постоянно образуются в любой клетке под воздействием как экзогенных, так и эндогенных факторов и способны по-разному влиять на работу ДНК-связывающих белков и ферментов. Один из наиболее распространенных вариантов таких повреждений – ДНК-белковые сшивки, которые могут возникать под действием различных соединений и метаболитов, а также являться естественными интермедиатами процессов репликации и reparации. При этом особенности влияния таких сшивок на работу репликативных и специализированных ДНК-полимераз разных классов о настоящего времени оставались почти не исследованными. Так как повреждения ДНК могут иметь катастрофические последствия для репликации генома, то многие ДНК-повреждающие агенты используются в качестве противораковых препаратов. Поиск и характеристика новых вариантов таких соединений являются очень актуальными с точки зрения их использования в терапевтической практике. В целом, понимание механизмов действия разных типов повреждений ДНК на работу ферментов reparации и репликации имеет большое фундаментальное и практическое значение, можно смело утверждать, что это одна из центральных проблем современной молекулярной биологии и медицины. Автору представленной диссертации работы удалось внести существенный вклад в решение данной проблемы. В работе впервые проведен систематический анализ влияния ДНК-белковых сшивок и прочно связанных ДНК-белковых комплексов на работу различных ДНК-полимераз, а также изучено влияние других типов модификации

ДНК (соединения платины и модифицированные АП-сайты) на синтез ДНК ферментами разных классов. В результате удалось выявить общие принципы и различия в действии ДНК-белковых сшивок и нековалентных комплексов на активность ДНК-полимераз и определить особенности влияния новых типов повреждений ДНК на процессы репликации.

Диссертация Юдкиной А.В. изложена на 139 страницах и включает в себя следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список сокращений и Список цитированной литературы, содержащий 365 ссылок. Краткая характеристика отдельных разделов работы приведена ниже.

Обзор литературы посвящен повреждениям ДНК, путем их репарации и влиянию различных типов повреждений на процессы репликации. В первой части обзора рассмотрены наиболее распространенные типы повреждений ДНК, способных блокировать репликацию, включая АП-сайты и их производные, ковалентные сшивки ДНК, а также ДНК-белковые сшивки, которым уделено особое внимание. Рассмотрены различные пути репарации ДНК-белковых сшивок и их влияние на процессы репликации. Следует еще раз отметить, что, несмотря на интенсивные исследования процессов репликации и репарации ДНК, про влияние ДНК-белковых сшивок на работу ДНК-полимераз известно очень мало, что подчеркивает актуальность работы. В следующих разделах рассмотрены общие данные о влиянии нековалентных ДНК-белковых комплексов на процессы репликации (на примере ДНК-гликозилаз и Cas9-нуклеазы), а также описано разнообразие ДНК-полимераз и их способность к репликации поврежденной ДНК. Эти разделы достаточно краткие – понятно, что весь объем информации о репликации поврежденной ДНК разными семействами ДНК-полимераз просто невозможно рассмотреть на нескольких страницах, – но они необходимы для целостного понимания работы. Нужно отметить очень большой объем литературы, рассмотренной в рамках обзора (почти 300 ссылок). При этом обзор написан четким и понятным языком и может быть интересен для широкого круга исследователей в различных областях молекулярной биологии и биохимии.

В разделе Материалы и Методы достаточно подробно описаны использованные реагенты и материалы и основные методы исследований. Работа проведена с применением широкого спектра методов, включая получение исследуемых ферментов и ДНК-субстратов, получение ДНК-белковых сшивок, изучение влияния модификаций ДНК на активность полимераз, а также взаимного влияния ДНК-полимераз и ДНК-связывающих белков, получение и анализ новых видов модификаций ДНК, измерение кинетических параметров включения нуклеотидов полимеразами, а также методы молекулярного докинга. Возможно, стоило бы также внести в данные раздел описание методик выделения ферментов, использованных в работе, особенно тех, которые получены непосредственно автором диссертации, хотя они и были получены по уже опубликованным методикам (раздел 3.1.2, стр. 50). В целом, все использованные методы описаны достаточно детально и могут быть воспроизведены в лаборатории.

Раздел Результаты и обсуждение состоит из четырех взаимосвязанных разделов, которые, в соответствии с поставленными задачами, посвящены изучению действия на работу полимераз ДНК-белковых сшивок, прочных нековалентных ДНК-белковых комплексов, новых соединений платины (полиоксониобата), а также модифицированных АП-сайтов (аддукта АП-сайта с метоксиамином). Для всех четырех типов модификаций автором проведены детальные эксперименты с широким спектром ДНК-полимераз, что позволило выявить важные закономерности во влиянии разных типов модификаций ДНК на репликацию. На мой взгляд, стоит отметить следующие наиболее интересные результаты, полученные в диссертации.

- 1) Наиболее значимой и законченной частью работы выглядит анализ влияния ДНК-белковых сшивок на работу ДНК-полимераз разных классов. Показано, что ДНК-белковые сшивки являются непреодолимым препятствием для всех исследованных полимераз, но при этом конкретная картина удлинения ДНК вблизи сшивки сильно различается, что может иметь важное значение для reparации данных модификаций в клетке.
- 2) Показано, что некоторые ДНК-полимеразы способны ускорять работу ДНК-гликозилаз, образующих стабильные комплексы с ДНК; предположительно, это происходит за счет физических взаимодействий между полимеразами и

гликозилазами, причем по крайней мере в некоторых случаях для этого требуется синтез ДНК полимеразой. Подобное явление может играть роль в успешном протекании процессов репарации в клетке.

3) Детально исследовано влияние одной из модификаций АП-сайта, его аддукта с метоксиамином АП-МОХ, на активность ДНК-полимераз разных классов, в реакция присоединения единичных нуклеотидов и при процессивном удлинении праймера. Показано, что данная модификация намного стабильнее АП-сайта, но в целом влияет на активность полимераз сходным с ним образом. Полученные данные имеют важное значение с точки зрения использования метоксиамина в клинической практике совместно с ДНК-повреждающими агентами.

Большой объем работы и разнообразие экспериментальных данных делают почти неизбежным наличие некоторых пробелов или неточностей в описаниях экспериментов, а также вопросов к их интерпретации. Стоит подчеркнуть, что в целом научная значимость данной работы не вызывает сомнений, а перечисленные ниже замечания направлены на уточнение некоторых деталей экспериментов или их обсуждение; хочется надеяться, что они будут полезны автору в дальнейшей работе.

- 1) Активность полимераз на одноцепочечном ДНК-субстрате, содержащем сшивку с Fpg, оказывается очень низкой (рис. 20). При этом активность тех же полимераз на субстрате с запирающим праймером гораздо выше, удлиняется большая часть праймера. С чем это может быть связано? Может ли это объясняться тем, что использованная методика позволяет получить данный субстрат только в очень низкой концентрации (или его значительная часть по каким-то причинам не вступает в реакцию)? Проводили ли оценку доли активного ДНК-субстрата в этих экспериментах?
- 2) При измерении активности полимераз X- и Y-семейств на одноцепочечных ДНК-субстратах полимеразы бета и лямбда из-за низкой эффективности синтеза не доходят до места модификации даже на контрольной неповрежденной матрице, поэтому нельзя утверждать, что сшивка блокирует их работу (рис. 21А,Б).
- 3) В экспериментах по удлинению ДНК-праймера на матрицах с ДНК-белковыми сшивками (рис. 20-23), на мой взгляд, не всегда можно однозначно определить длину синтезированных ДНК-продуктов, так как рядом показаны только три маркерных

олигонуклеотида, длина которых различается более чем на 10 нуклеотидов. В связи с этим не всегда понятно, можно ли достоверно утверждать, что наблюдаемые различия в сайтах остановки полимераз в разных условиях составляют всего два-три нуклеотида.

4) В работе показано, что некоторые ДНК-полимеразы, в частности, фрагмент Кленова и полимераза бета (рис. 29 и 30) увеличивают активность ДНК-гликозилазы OGG1, вероятно, вытесняя ее из комплекса с продуктами реакции (хотя в случае полимеразы бета для этого не требуется синтез ДНК). При этом при анализе продуктов расщепления ДНК OGG1 (рис. 33) видно, что скорость расщепления исходного ДНК-субстрата меньше в присутствии данных полимераз и нуклеотидов, чем в их отсутствие. Не является ли это противоречием? (Возможно, что и нет, так как в первом случае речь идет о диссоциации комплекса, а во втором о расщеплении ДНК). Чем может объясняться замедление скорости катализа в присутствии полимераз?

5) На рис. 32 показано, что фрагмент Кленова обладает полимеразной активностью на том же ДНК-субстрате, с которым связана ДНК-гликозилаза OGG1, и в тех же условиях, в которых происходит стимуляция ее активности. Однако непонятно, можно ли утверждать, что наблюдаемый синтез ДНК происходит на тех же молекулах субстрата, с которыми связана гликозилаза. Так как на рисунке не приведен эксперимент в отсутствие OGG1, неизвестно, происходит ли при этом подавление активности полимеразы и ее остановка при столкновении с OGG1. Если такого подавления не происходит, не исключено, что полимеразная активность наблюдается на фракции ДНК, не связанной с OGG1. Проводили ли оценку эффективности образования комплекса OGG1 в этих условиях?

6) В экспериментах по стимуляции активности ДНК-гликозилаз ДНК-полимеразами имело бы смысл проверить дополнительные контрольные белки, способные подавлять неспецифические взаимодействия исследуемых белков с ДНК или их агрегацию. На мой взгляд, нельзя полностью исключить того, что в некоторых экспериментах стимуляция активности происходит просто из-за увеличения концентрации активной гликозилазы в реакции, например, за счет подавления ее неспецифического связывания или агрегации (особенно в тех случаях, когда

стимуляция наблюдается и в присутствии, и в отсутствие нуклеотидных субстратов). В подтверждение этого в случае с ДНК-гликозилазой NEIL1 в присутствии полимеразы бета происходит увеличение количества продукта, расщепленного гликозилазой, но кинетика при этом остается очень похожей, причем обе реакции достигают плато к 10-15 мин (рис. 35).

7) В работе показано, что большинство исследованных ДНК-полимераз ничего не может «сделать» с прочно связанной с ДНК Cas9-нуклеазой: наличие в реакционной смеси полимеразы никак не увеличивает скорость диссоциации Cas9, измеряемую по расщеплению вторичного субстрата (рис. 37). Полимераза бета увеличивает скорость работы Cas9, причем даже в отсутствие нуклеотидов, что пока остается необъясненным (в работе стоило бы показать, как выглядят продукты реакции в том и в другом случае). При анализе влияния dCas9 на активность полимераз (рис. 39) видно, что происходит замедление синтеза ДНК, но при этом все равно наблюдается постепенное удлинение продуктов (например, если сравнить дор. 2-5 и 6-9 для фрагмента Кленова на рис. 39Б). Как это можно объяснить со структурной точки зрения? Чем объясняются различия между полимеразами в расстоянии от сайта связывания dCas9, на котором происходят замедление и остановка синтеза?

8) Раздел работы про влияние полиоксониобата платины на активность ДНК-полимераз оставляет ощущение некоторой незаконченности. Это вполне допустимо, учитывая, что результаты опубликованы; более того, данные эксперименты являются первыми в изучении механизмов действия подобных соединений на репликацию ДНК и открывают новое направление исследований. В то же время, необходимо сказать, что пока эти механизмы остаются не вполне понятными. Авторы предполагают, что репликация подавляется именно за счет модификации ДНК, но эту гипотезу еще необходимо проверить. В проведенных экспериментах в одних условиях синтез ДНК подавляется примерно в два раза (рис. 41), а в других не меняется (рис. 42). В этих опытах использованы разные количества ДНК-полимераз и их разные соотношения к ДНК (кстати, стоило бы точно указать использованные концентрации и соотношения в каждом случае), но в обоих экспериментах должна происходить сходная модификация ДНК и/или образование ДНК-белковой сшивки и, соответственно, падение концентрации ДНК-субстрата или фермента, поэтому непонятно, почему

только в одном случае наблюдается ингибирование активности. Природа «тяжелого» аддукта, наблюдавшегося на рис. 41, пока остается невыясненной, хотя в модельных опытах с короткими олигонуклеотидами и показано, что данное соединение способно взаимодействовать с ДНК. В целом, выводы по этой части работы стоило бы сделать немного более осторожными. В работе действительно показано подавление активности полимераз полиоксониобата платины и подтверждено формирование аддуктов этого соединения с ДНК, но являются ли именно эти аддукты причиной ингибирования синтеза, на мой взгляд, пока не совсем ясно.

9) В экспериментах по процессивному синтезу ДНК на матрицах с АП-сайтом и АП-МОХ достаточно сложно установить, какие именно нуклеотиды включаются напротив поврежденного нуклеотида, так как все они имеют сходную подвижность, даже при наличии маркеров длины рядом (при этом сделанные предположения выглядят правдоподобно, учитывая другие имеющиеся данные).

10) В работе утверждается, что при наличии в реакции двух ДНК-полимераз (каппа и бета; каппа и фрагмент Кленова; каппа и RB69) происходит значительно увеличение эффективности синтеза ДНК на матрице с АП-сайтом или АП-МОХ (при этом данные показаны только для комбинации полимеразы каппа и фрагмента Кленова, рис. 50Б). Для подкрепления верности данного утверждения стоило бы привести количественный анализ эффективности синтеза ДНК в том и другом случае. Визуально распределение и количество продуктов синтеза ДНК в реакциях только с фрагментом Кленова (рис. 49А) и с комбинацией полимеразы каппа и фрагмента Кленова (рис. 50Б) очень сходны.

11) Можно ли утверждать, что полимераза каппа действительно существенно лучше использует субстрат с АР-МОХ, чем просто АР? Судя по включению единичного нуклеотида, это так, но при исследовании процессивного синтеза особенных различий не видно, особенно учитывая, что количественный анализ данных не приводится (рис. 50А).

12) На большинстве приведенных в работе графиков (рис. 29, 34, 35, 37, 38, 41, 42, 51) показаны ошибки измерений, но нигде не сказано, что это за ошибки (вероятно, стандартные отклонения); не всегда сказано, сколько раз проводили тот или иной эксперимент. На рис. 46 нет ошибок измерений. Остается неизвестным, являются ли

наблюдаемые различия статистически значимыми и если да, то с каким уровнем достоверности (стоило бы посчитать Р-значения). Это особенно важно в тех случаях, когда наблюдается не очень сильная стимуляция работы ДНК-гликозилаз ДНК-полимеразами (в 2 раза), а ошибки измерений достаточно большие. Кроме того, стоило бы привести количественный расчет эффективности реакции для некоторых из экспериментов, которые приведены только в виде радиоавтографов, если на их основе делаются выводы о количественных различиях (например, на рисунках 49 и 50, где сравнивается процессивный синтез на матрицах с АП-сайтом и АП-МОХ разными ДНК-полимеразами).

13) В рукописи не показано достаточно большое количество экспериментов, которые обсуждаются в тексте. Иногда автор описывает результаты и указывает, что данные не приведены, а в некоторых случаях просто приводит результат без какой-либо ссылки. Мне кажется, что стоило бы по возможности показывать все обсуждаемые данные, так как их интерпретация может быть неполной или в каких-то случаях даже оказаться ошибочной – лучше предоставить читателю возможность самому познакомиться с результатами.

Необходимо еще раз сказать, что сделанные замечания совершенно не снижают значимости проведенных исследований. Высокое научное качество работы, достоверность результатов и обоснованность выводов, сделанных на их основе, не вызывают сомнений. Результаты диссертационной работы опубликованы 4 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, в том числе PLoS One, L. Biomol. Struct. Dyn., Genes и Биоорганическая химия. Результаты представлены на нескольких крупных международных научных мероприятиях. Автореферат диссертации полностью отражает содержание и выводы работы.

В целом, диссертация является целостным исследованием, в котором изучены механизмы действия блокирующих повреждений ДНК на работу ДНК-полимераз разных классов и разных организмов. Работа написана хорошим языком и почти не содержит ошибок и опечаток, экспериментальные данные представлены четко и логично и хорошо проиллюстрированы. Диссертация представляет значительный научный и практический интерес и заслуживает внимания широкого круга исследователей, занятых проблемами стабильности генома. Стоит подчеркнуть, что

работа открывает новые перспективы в исследованиях действия различных типов повреждений ДНК на процессы репликации и репарации генома.

По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Юдкиной А.В. полностью отвечает критериям, определенным в пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, и оформлена согласно положениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, автор диссертационной работы Юдкина Анна Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

заведующий Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения

Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

Кульбачинский Андрей Владимирович

тел.: +7(499)1960015, e-mail: avkulb@yandex.ru

123182, г. Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2.

01.09.2020

Подпись А.В. Кульбачинского удостоверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения
Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

кандидат биологических наук

Л.Е. Андреева

