

Отзыв на автореферат диссертации
Кургиной Татьяны Андреевны
«Влияние фактора модификации гистонов HPF1 на
активность поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 при взаимодействии с
нуклеосомами», представленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

Работа Т.А. Кургиной посвящена исследованию механизма действия фактора PAR-илирования гистонов HPF1 в регуляции каталитической активности PARP1 и PARP2 в контексте нуклеосом. Актуальность данной темы определена тем, что HPF1 – относительно недавно обнаруженный фактор PAR-илирования гистонов, при этом механизмы, лежащие в основе взаимодействия данного фактора с PARP1/PARP2, изучены недостаточно полно. Данное направление исследований представляет несомненный фундаментальный интерес для развития молекулярной биологии, поскольку HPF1 является до сих пор единственным известным фактором, меняющим аминокислотную специфичность PAR-илирования. Кроме того, у данной работы есть очевидные практические приложения в связи с тем, что PARP1 и PARP2 являются перспективными мишенями для разработки лекарственных препаратов таргетного действия для лечения онкологических заболеваний, поэтому выявление путей регуляции и модуляции каталитической активности данных белков будет безусловно способствовать разработке лекарств – ингибиторов PARP1/PARP2 более эффективного действия.

Автором разработаны уникальные экспериментальные подходы, в частности, методика исследования активности PARP1 и PARP2 *in vitro* в реальном времени в присутствии различных ДНК-активаторов, в том числе нуклеосом, основанную на флуоресцентной спектроскопии. Их использование в сочетании с современными методами биохимического анализа позволило автору обнаружить, что HPF1 способен стимулировать начальные стадии реакции PAR-илирования. При этом было показано, что HPF1 оказывает более значительное влияние на активность PARP2. Особенно интересным представляется наблюдение автора о том, образование гибридного активного центра PARP:HPF1 приводит к подавлению элонгации и укорочению синтезируемого PAR. Достоинством работы Кургиной Т.А. является также предполагаемый механизм PAR-илирования в комплексах HPF1 с PARP1 и PARP2, который заключается в цикличности присоединения HPF1 к комплексу ДНК/НСР для инициации PAR-илирования с последующей диссоциацией HPF1 для связывания со следующей молекулой PARP для очередного этапа инициации PAR-илирования, что в целом приводит к увеличению количества ADP-рибозы в ядре.

Данные, полученные в работе, открывают новое направление в исследовании механизмов и регуляции процесса PAR-илирования, а использованная автором оригинальная экспериментальная модель может быть использована для испытания различных лекарственных препаратов, в том числе противораковых соединений.

Отмечая несомненные достоинства диссертации Кургиной Т.А. полагаю необходимым указать на некоторые замечания и ряд вопросов, возникших в ходе чтения автореферата.

1. На фореграммах на рисунках 3, 4, 7, 10, 11 не приведены маркеры молекулярных весов, что существенно затрудняет чтение фореграмм.
2. На фореграммах на рисунках 4, 10 и 11 не видны входы в лунки, что затрудняет понимание о образовавшихся в ходе реакций агрегатах (материала, не вошедшего в лунки). Мы, в наших исследованиях вынуждены обращать на это внимание, поскольку PARP1 и PARP2 склонны агрегировать и ДНК и нуклеосомы.
3. На фореграммах на рисунках 3 не приведены данные по PAR-илированию PARP1/PARP2 без HPF1, поэтому трудно понять исходный уровень модификации данных белков в отсутствие фактора HPF1. Как правило на фореграммах и вестерн-блоттингах в наших исследованиях, это визуализируется как размытая полоса выше 114 кДа в случае PARP1. Отсутствие таких полос на фореграммах вызывает вопросы о активности PARP1. Тем более обсчет фореграммы представленный на рис 3в указывает на усиление PARилирования самого PARP1, при этом на фореграмме подобный эффект не наблюдается (должны были бы наблюдаться полосы более высокого молекулярного веса, чем сам PARP1). Автор указывает на то, что в присутствии HPF1 усиливается гидролазная активность PARP1, но концентрационной зависимости гидролазной активности в отношении самого PARP1 не наблюдается (рис 3а,в). Почему гидролазная активность наблюдается только в отношении PARилированных гистонов следует объяснить.
4. На рис 4 не представлена фореграмма зависимости стимулирующего действия HPF1 на PARP2 от концентрации NAD+, поэтому трудно судить на основании каких данных сделан обсчет, представленный на рис 4б.
5. Вывод 4 автора о том, что «в присутствии HPF1 на нуклеосомах, гистоны становятся основной мишенью модификации PARP2. PARP1 преимущественно катализирует аутомодификацию» - следует пояснить. Поскольку исходя из данных на рис 3 в,г – мы видим, что аутомодификация PARP2 намного сильнее, чем аутомодификация PARP1, при этом уровень PARилирования гистонов белками PARP1/PARP2 практически одинаковый.

Высказанные замечания не ставят под сомнение основные выводы и научную ценность работы Кургиной Т.А. Многие результаты этой работы опубликованы в высокорейтинговых журналах. Новые научные результаты, полученные диссертантом, безусловно будут иметь существенное значение для развития молекулярной биологии и различных практических задач фармакологии.

Кандидат биологических наук,
доцент биологического факультета
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова

ПОДПИСАНО
ЗАВЕРЯЮЩИМ
Документовед



Н.В. Малюченко