

ОТЗЫВ

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

Диссертационное исследование Т.А. Кургиной направлено на оценку влияния фактора модификации гистонов HPF1 на активности белков PARP1 и PARP2. PARP-белки являются важными участниками процессов репарации различных повреждений ДНК. В диссертационной работе автор концентрируется на вопросах, связанных с участием PARP в эксцизионной репарации оснований, а также на влиянии нуклеосомной укладки на процесс PAR-илирования. Актуальность работы связана с ключевой ролью PARP в инициации и самом процессе репарации ДНК. Ингибирование различных путей репарации ДНК уже используется в терапии многих онкологических заболеваний. Именно применение ингибиторов PARP позволило достичь значительного прогресса в терапии некоторых видов рака молочной железы и яичников. Поэтому, безусловно, расшифровка деталей работы молекулярного механизма участия PARP в репарации ДНК - это важный этап для поиска новых потенциальных таргетов для терапии онкологических заболеваний. Однако также хочется подчеркнуть и фундаментальную значимость полученных в работе результатов для расширения знаний о процессах поддержания стабильности генома и реализации генетической информации.

Работа написана по традиционной схеме, содержит разделы "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты и их обсуждение", "Заключение" и "Выводы".

Во "Введении" кратко обосновывается актуальность работы, формулируются цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также приводятся положения, выносимые на защиту. Этот раздел хорошо написан и позволяет получить первое представление об области исследования, масштабах проделанной работы и важности полученных результатов.

В главе Обзор литературы проводится анализ публикаций по теме исследования. Этот раздел хорошо структурирован и логично скомпонован. В разделе кратко описаны базовые понятия и механизмы PAR-илирования, а затем детально разобраны вопросы, непосредственно касающиеся предмета исследования диссертационной работы. В частности, собраны работы, посвященные анализу взаимодействия PARP1 и PARP2 с поврежденной ДНК и нуклеосомами. Подробно анализируются имеющиеся сведения об изменении аминокислотной специфичности PAR-илирования при образовании гибридного активного центра с белком HPF1. Также разбираются вопросы парилирования гистонов и возможного функционального значения этого процесса в репарации ДНК. Несомненным достоинством главы является раздел Заключение, в котором тезисно сформулированы основные имеющиеся в литературе данные, непосредственно касающиеся темы исследования и полученных в работе результатов. Также хочу подчеркнуть достаточность Обзора литературы - в нем есть все, что нужно для понимания места диссертационной работы в мировой науке. Также стоит отметить неизбыточность - в обзоре нет лишних деталей и освещения соседних областей, не связанных непосредственно с полученными результатами.

Глава “Материалы и методы” написана с детализацией, достаточной для понимания технических тонкостей проведенных работ и воспроизведения основных экспериментов.

Глава “Результаты и их обсуждение” начинается с разработки метода анализа активности PARP1 и PARP2 в реальном времени с помощью измерения анизотропии флуоресценции. Этот красивый подход позволил получить оценки кажущихся равновесных констант диссоциации комплексов PARP1 и PARP2 с ДНК и NCP (EC_{50}), а также оценить значения IC_{50} для ингибиторного действия 7mGua и 8oh7mGua в отношении PARP1.

Важным этапом для проведения исследований явилось создание модельных ДНК-активаторов PARP1/2, содержащие флуоресцентные метки. В работе подробно описывается создание таких ДНК-активаторов и конструирование на их основе нуклеосом. Приводится оценка доступности оснований в координатах позиции на нуклеосоме. Далее с использованием полученных ДНК-активаторов в работе проводится оценка активности PARP1/2, а также их взаимодействия с фактором HPF1. Подробно оцениваются кинетика протекания реакции PAR-илирования,

количественные характеристики полимера PAR, влияние HPF1 на инициацию и элонгацию реакции PAR-илирования. Оценивается специфичность PAR-илирования гистонов в составе нуклеосомы.

На основании полученных результатов в диссертации сформулированы пять выводов. Мне кажется, что первый вывод об оптимизации методики определения сродства и активности PARP1 и PARP2 *in vitro* является техническим, и поэтому автору не стоило выносить его в качестве научного вывода диссертационной работы. Остальные четыре вывода являются обоснованными, в полной мере отражают выявленные закономерности и полностью соответствуют полученным результатам.

В целом, диссертация хорошо написана, работа оставляет впечатление качественно выполненной и законченной. Тем не менее, имеется ряд замечаний и вопросов, которые приведены ниже.

1. В диссертации автор использует широкий ряд синонимов для обозначения ДНК с однонуклеотидной брешью (брешь в ДНК, интермедиат эксцизионной репарации оснований, повреждения ДНК — интермедиата BER, Gap ДНК). Это затрудняет восприятие работы. Следовало бы или в явном виде привести этот список синонимов в начале диссертации, или, лучше, использовать один термин во всей работе.
2. Часть результатов работы представлена в виде таблиц (таблицы 3,4,5,6,7,8,9). Анализировать и сравнивать такие данные читателю очень неудобно, поэтому удачнее было бы визуализировать эти значения в виде графиков и диаграмм.
3. В работе проведено исследование ингибиторного действия 7-метилгуанина и 8-гидрокси-7-метилгуанина на PARP1, однако полученные результаты дальше никак не используются для достижения цели исследования и не отражены в выводах, поэтому остается неясной связь этой части работы с остальными экспериментами.
4. На автордиограммах на рисунках 15 и 25 хорошо заметны полосы легче PARP1, интенсивность которых растет с ростом концентрации HPF1. Какова природа этих полос? Могут ли они соответствовать примесям иных белков присутствующих в препаратах рекомбинантного белка?
5. В Материалах и методах автор пишет, что “Количественные данные, представленные в виде графиков, были получены не менее чем в трех

независимых экспериментах.” Однако из текста диссертации не понятно, что автор подразумевает под термином независимые эксперименты? Какие этапы независимо реплицировались? Например эксперимент мог быть повторен три раза с одними и теми же стоками реактивов, или же в каждой из реплик использовали независимо выделенный препарат рекомбинантного белка и тогда нивелируется влияние возможных примесей в препаратах?

6. В диссертации отмечается, что PARP1, вероятнее всего, образует комплексы и с брешью, и с неповреждённой ДНК, но их доля существенно ниже доли комплексов с тупыми концами. Поэтому кажется, что оценка активности PARP1 при взаимодействии с брешью и неповреждённой ДНК может быть неточной из-за “засвечивающей” активности находящегося рядом тупого конца ДНК. В связи с этим нельзя ли экранировать (спрятать) конец ДНК от PARP, например ковалентно зашив цепи ферментом TelN Protelomerase?
7. В работе описываются эффекты влияния позиции брешки относительно нуклеосомы, например, репертуар PAR-илированных гистонов меняется при обработке PARP2. Однако для создания нуклеосом используется только одна конкретная последовательность 603, строго ориентированная относительно гистонового кора. Как в таком дизайне эксперимента отличить влияние позиции брешки в нуклеосоме от влияния нуклеотидного контекста, который также меняется при изменении позиции брешки?

Вместе с тем, отмеченные недостатки не снижают моей высокой оценки работы Т.А. Кургиной, а замечания носят рекомендательный характер. Работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные, хорошо оформлена и легко читается. Полученные автором результаты, наряду с богатым справочным материалом, несомненно, будут полезны не только исследователям, занимающимся вопросами механизмов эксцизионной репарации ДНК, но и могут быть использованы в практических целях, а также при подготовке учебных курсов по молекулярной биологии и генетике. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Заключение. Диссертационная работа на тему «Влияние фактора модификации гистонов HPF1 на активность поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 при взаимодействии с

нуклеосомами» соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемых к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, соискатель Кургина Татьяна Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией генетики развития,
ФИЦ ИЦиГ СО РАН, кандидат биологических наук
Н.Р. Баттулин

03.10.2023

Адрес места работы:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10
Для телеграмм: Новосибирск 90, ЦИТОЛОГИЯ
Телефон: +7(383) 363-49-80
Факс: +7(383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru

Подпись Баттулина Н.Р. заверяю:

ученый секретарь ИЦиГ СО РАН, к.б.н.

Орлова Г.В.



03.10.2023