

ОТЗЫВ

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

Диссертационная работа Кургиной Т. А. посвящена исследованию механизма реакций, катализируемых ферментами поли(ADP-рибоза)полимеразами 1 и 2 (PARP1 и PARP2) в присутствии белкового фактора поли(ADP-рибозил)ирования (PAR-илирования) гистонов (HPF1) и нуклеосом.

Ферменты PARP1 и PARP2 участвуют в посттрансляционной модификации белков, добавляя к их остаткам аспартата или глутамата разветвленные цепи поли(ADP-рибозы), используя NAD⁺ в качестве источника мономерных фрагментов. Оба фермента активируются при связывании с разрывами ДНК. В клетках человека PARP1 выступает как доминантная поли(ADP-рибозо)полимераза, а PARP2 обладает менее выраженной активностью и присутствует в меньших количествах. К числу биологически важных субстратов PARP1 и PARP2 относятся гистоновые белки. Недавно открытый белок HPF1 изменяет специфичность PAR-илирования с Asp/Glu на остатки серина, что способствует релаксации хроматина и привлечению факторов репарации, играя таким образом ключевую роль в ответе на повреждение ДНК. Поскольку ингибирование ферментов PARP недавно вошло в клиническую практику как стратегия химиотерапии онкологических заболеваний, любые данные об их механизме и регуляции представляют значительный интерес. Таким образом, актуальность работы Кургиной Т. А. как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Кургиной Т. А. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы (которому дано самостоятельное название «Классические функции поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 и их взаимодействие с HPF1 — новым фактором поли(ADP-рибозилирования) гистонов»), описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 325 наименований.

Обзор литературы дает достаточно подробную информацию о структуре и каталитическом механизме ферментов PARP1 и PARP2, их взаимодействии с изолированной ДНК и с нуклеосомами, образовании немембранных PAR-опосредованных компартментов, биологической роли реакций PAR-илирования разных белков-мишеней и уникальном механизме действия белка HPF1, который образует гибридный активный центр с белками

PARP. Также приведены краткие сведения об ингибиторах PARP, используемых в клинике. В целом литературный обзор отвечает поставленным задачам, однако в свете того, что основная часть работы посвящена взаимодействию PARP и HPF1 с нуклеосомами, в нем хотелось бы видеть часть, посвященную специфике повреждения и репарации ДНК в нуклеосомных частицах: за последние годы было опубликовано много статей на эту тему. Также в качестве небольшого замечания можно отметить неверную ориентацию цепей ДНК в схеме репарации на рис. 5.

Глава «Экспериментальная часть» содержит описание материалов, оборудования и современных биохимических и молекулярно-биологических методов, использованных в работе. Методы исследования описаны с достаточной степенью детализации, и к этому разделу практически нет замечаний, за исключением того, что в нем хотелось бы видеть данные о степени гомогенности использованных в работе белковых препаратов, в особенности коровых гистонов.

Раздел диссертационной работы «Результаты и обсуждение» разделен на три части. В первой из них предложен новый метод детекции активности ферментов PARP, основанный на измерении анизотропии флуоресценции. С его помощью охарактеризовано ингибирующее действие некоторых производных гуанина на PARP1. Далее метод был оптимизирован для детекции активности при связывании PARP1 и PARP2 с реконструированными нуклеосомами, в том числе содержащими повреждения ДНК в разных позициях, измерено сродство обоих ферментов к таким конструкциям. Во второй части соискатель анализирует влияние фактора HPF1 на активность PARP1 и PARP2, соотношения активностей ферментов PARP, направленных на PAR-илирование гистонов и ауто-PAR-илирование, зависимость эффективности реакции от присутствия ДНК, и на разные стадии PARP-катализируемых (инициацию, элонгацию, гидролиз NAD⁺). В третьей части изучено влияние HPF1 на аутомодификацию PARP и PAR-илирование гистонов при наличии повреждений (однонуклеотидных брешей) в ДНК, в том числе зависимость эффекта HPF1 от положения брешей в составе реконструированной нуклеосомы.

В ходе работы соискателем показано, что между белками PARP1 и PARP2 существует разница в узнаваемых структурах ДНК: в то время как первый преимущественно взаимодействует с концами ДНК (как свободной, так и в составе нуклеосом) и с меньшим сродством — с однонуклеотидными брешами и с неповрежденной ДНК, второй эффективно связывается с брешами в составе ДНК, но не с концами или с неповрежденной ДНК. Белковый фактор PAR-илирования гистонов HPF1 оказывает стимулирующее действие на инициацию PAR-илирования ферментами PARP1 и PARP2, но ингибирует элонгацию реакции. В результате общее количество PAR и длина синтезируемых цепей снижается, и наблюдается

непродуктивный гидролиз NAD^+ . При этом PARP1 преимущественно катализирует ауто-PAR-илирование как в присутствии, так и в отсутствие HPF1, а активность PARP2 в основном направлена на гистоновые белки и значительно стимулируется брешами в ДНК, причем в зависимости от позиции бреши могут модифицироваться разные гистоны. Предложен уточненный механизм PAR-илирования в комплексах HPF1/PARP, в котором одна молекула PARP взаимодействует с комплексом HPF1 с другой молекулой PARP и подвергается модификации. После инициации роста цепи HPF1 диссоциирует из комплекса с PARP и освобождает сайт элонгации в активном центре, а каталитически активная субъединица PARP продолжает синтез PAR. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, во всех случаях представляется вполне аргументированной.

Замечания к работе немногочисленны. Часть, посвященная ингибированию PARP1 7-метилгуанином и 8-гидрокси-7-метилгуанином выглядит выпадающей из основного контекста работы, хотя, конечно, имеет право на включение в диссертацию в свете апробации методики определения активности фермента. В части, посвященной влиянию брешей в ДНК на белки PARP и HPF1, не приведены данные контрольных экспериментов, показывающие, что брешь действительно образуется и какой процент нуклеосом ее содержит; из литературы известно, что при расщеплении ДНК-гликозилазами и АП-эндонуклеазами ДНК в составе нуклеосомных частиц трудно добиться 100%-ной конверсии даже в Out-позициях нуклеотидов. Здесь же стоило бы обсудить возможное изменение конформации нуклеосомной ДНК при образовании бреши и его влияние на связывание PARP: будут ли эти белки, например, по-другому связываться с АП-сайтами или их аналогами, в которых сохраняется ковалентная непрерывность остова? Никак не обсуждается возможность влияния гетерогенности гистоновых белков в препарате из эритроцитов курицы на результаты: в таких препаратах, как правило, присутствует смесь нескольких протеоформ гистонов H3 и H4 и заметное количество H2A.X и H2A.Z, не различимых на одномерном электрофорезе, и, возможно, модификация идет по ним, а не по основным коровым гистонам.

Сделанные замечания не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Работа Кургиной Т. А. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Результаты опубликованы в 6 статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованных автором работ по данной теме.

Работа Кургиной Т. А. является завершенной в целом научно-квалификационной работой, в которой решена задача установления механизма действия фактора PAR-илирования гистонов HPF1 в регуляции каталитической активности ферментов PARP1 и PARP2 в

контексте нуклеосом, имеющая существенное фундаментальное значение для понимания контроля процессов репарации ДНК и динамики хроматина и для поиска новых специфических ингибиторов PARP1 и PARP2, пригодных для противоопухолевой терапии.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание ученой степени кандидата наук, а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации Кургина Татьяна Андреевна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, член-корреспондент РАН

Жарков Дмитрий Олегович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Телефон: (383) 363-51-50

Факс: (383) 363-51-53

Эл. адрес: niboch@niboch.nsc.ru

Подпись Жаркова Дмитрия Олеговича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, к. ф. н.



Логашенко Е. Б.

9 ноября 2023 г.