

Отзыв

Официального оппонента Колесниковой Татьяны Дмитриевны 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 на соискание учёной степени кандидата наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Диссертационная работа Кургиной Т.А. посвящена исследованию механизма действия фактора PAR-илирования гистонов HPF1 в регуляции каталитической активности ключевых эффекторов системы репарации ДНК — ферментов PARP1 и PARP2.

Актуальность диссертационного исследования

ADP-рибозилирование — эволюционно консервативная посттрансляционная модификация, участвующая в различных биологических процессах, включая ответ на повреждение ДНК, модуляцию хроматина, репликацию ДНК, транскрипцию, иммунный ответ и др. Катализируют ADP-рибозилирование представители семейства поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP). Среди них, ферменты PARP1 и PARP2 являются ДНК-зависимыми поли(ADP-рибоза)полимеразами и локализуются ядре. Данные ферменты — перспективные мишени противоопухолевой терапии: в настоящее время многие ингибиторы PARP находятся на различных стадиях клинических и доклинических испытаний, а олапариб, рупартиб, нирапариб и талазопариб уже используются в клиниках для лечения рака. Кроме того, ингибиторы PARP в настоящее время рассматриваются в качестве препаратов для лечения нейродегенеративных и вирусных заболеваний, а также в качестве противовоспалительной терапии инфаркта миокарда и инсульта. Недавно был обнаружен новый белок-партнёр PARP1 и PARP2 — фактор PAR-илирования гистонов 1 (HPF1), который регулирует активность и специфичность PARP1 и PARP2 и образует с ними совместный активный центр. Изучению влияния данного фактора на активность ферментов PARP1 и PARP2 и посвящена работа Кургиной Татьяны Андреевны. Ранее было показано подавление активности данных ферментов в присутствии фактора HPF1, однако, в представленной работе показано стимулирующее действие фактора на начальные стадии реакции ADP-рибозилирования.

Таким образом, тема диссертационной работы Кургиной Татьяны Андреевны «Влияние фактора модификации гистонов HPF1 на активность поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 при взаимодействии с нуклеосомами» обладает несомненной

актуальностью и представляет большой интерес для понимания функционирования ферментов, катализирующих ADP-рибозилирование в поддержании стабильности генома. Это имеет большое значение не только для фундаментальной науки, но и для медицины, в том числе персонализированной.

Структура работы

Материал диссертации изложен на 125 страницах машинописного текста, включает 33 рисунка и 9 таблиц. Диссертационная работа написана в соответствии с требованием к оформлению работ и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», который включает 325 литературных источников.

В разделе «Введение» кратко охарактеризована актуальность проблемы, четко сформулированы цели и задачи исследования, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту, сведения о степени личного вклада автора, данные об апробации результатов и о публикациях по теме диссертационной работы. В самом начале приведен список сокращений и условных обозначений.

Глава «Обзор литературы» посвящена описанию литературных данных о функциях поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 и их взаимодействию с HPF1 — новым фактором поли(ADP-рибозилирования) гистонов. Раздел хорошо структурирован, написан понятным языком, дает хорошее представление о структуре PARP1 и PARP2, разнообразии потенциальных мишеней для связывания, разнообразии стратегий связывания с ДНК и хроматином, механизмах действия и возможных путей регуляции. Хорошо описаны методологические подходы, применявшиеся для получения этих данных. Приводится достаточно информации, необходимой для понимания методологии, использованной собственно в диссертационной работе. Обсуждается механизм и функции PAR-илирования в клетках. В частности, мне было очень интересно читать, как PARP и PAR-илирование вписываются в общий сценарий событий, происходящих в ответ на различные повреждения ДНК. Следующая часть обзора посвящена недавно открытому и мало изученному фактору PAR-илирования гистонов 1 (HPF1). Описывается предполагаемый механизм образования гибридного активного центра PARP1/2:HPF1, предполагаемые активности и функции комплекса HPF1 с PARP1/2. Последней частью обзора идет глава об ингибиторах PARP1 и PARP2. Эта часть связывает фундаментальные исследования механизмов действия PARP и прикладные разработки, активно используемые в медицине. Подчеркивается важность дальнейшего поиска новых

веществ, позволяющих управлять активностью PARP и новых экспериментальных систем для изучения активности этих веществ. В конце обзора литературы делается краткое, но емкое заключение, в котором автор подчеркивает актуальность решаемых в рамках диссертационной работы задач в контексте накопленных к началу работы литературных данных.

Глава «Материалы и методы» демонстрирует широкий диапазон классических молекулярно-биологических методов, а также изящные методологические подходы, разработанные Татьяной Андреевной в рамках диссертационного исследования. Все методы описываются очень детально, четко и понятно.

Глава 3 - «Результаты и их обсуждение». В начале главы описывается разработка и апробация новой методики, позволяющей быстро и эффективно проводить количественное исследование активности PARP1 и PARP2 в реальном времени на основании измерения анизотропии флуоресценции. Разработанная методика является, с одной стороны, основой всей дальнейшей работы, с другой стороны, позволяет охарактеризовать и сравнить ингибиторные свойства 7mGua и его метаболита 8oh7mGua в отношении PARP1 человека. Этот результат может иметь прикладное значение. Далее описывается оптимизация метода непосредственно для решения поставленных в диссертационной работе задач. Разрабатывается система на основе двух флуоресцентных меток, позволяющих отдельно детектировать эффект PARP на концевые и центральные участки молекулы «ДНК-активатора». Большая часть работы посвящена анализу связывания PARP1 и PARP2 с различными ДНК-активаторами. Татьяна Андреевна убедительно показывает, что PARP1 и PARP2 имеют разное сродство и специфичность к повреждениям ДНК и ДНК в нуклеосомах. Наибольшую аффинность PARP1 проявляет к тупым концам ДНК. PARP2 связывается преимущественно с брешью в ДНК — интермедиатом эксцизионной репарации оснований.

Следующая часть работы посвящена решению основной задачи диссертации - изучению влияния фактора PAR-илирования гистонов HPF1 на активность PARP1 и PARP2. В ней убедительно показывается, что HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования PARP1 и PARP2 одновременно с подавлением элонгации PAR-илирования. Глава впечатляет разнообразием тестовых систем, методических подходов и, несомненно, иллюстрирует проделанный автором диссертации большой шаг в направлении понимания механизмов участия HPF1 в регуляции PAR-илирования.

Все результаты изложены в соответствии с поставленными задачами и подробно обсуждаются. Приведенные рисунки наглядно иллюстрируют полученные данные.

После главы «Результаты и обсуждение» следует «Заключение», в котором кратко обобщаются полученные результаты и их значимость, а также на основании полученных результатов формулируется новая модель механизма HPF1-зависимой стимуляции ферментов PARP1 и PARP2 в реакции авто-PAR-илирования и гетеро-PAR-илировании гистонов. Показано влияние HPF1 на этапах инициации и элонгации PAR-илирования.

Выводы работы четко сформулированы и соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Научная новизна и практическая значимость работы

Диссертационная работа Кургиной Татьяны Андреевны является первым детальным исследованием механизма действия фактора PAR-илирования гистонов 1 на каталитическую активность ферментов PARP1 и PARP2. Автором установлено, что HPF1 стимулирует стадию инициации реакции ADP-рибозилирования, повышая её скорость и эффективность. При этом, образование совместного активного центра PARP:HPF1 приводит ко подавлению стадии элонгации поли(ADP-рибозил)ирования. Проведённое исследование показывает, что для эффективного синтеза поли(ADP-рибозы) необходима диссоциация HPF1 из совместного активного центра, при этом между проявлением эффектов стимуляции инициации и подавления элонгации зависит от локального соотношения PARP:HPF1. Таким образом, изменение экспрессии данных белков будет влиять на свойства синтезированной ADP-рибозы и развёртывание репарационных машин в ответ на повреждение ДНК. Результаты, полученные в данной работе, могут иметь важное практическое значение при разработке новых поколений препаратов - ингибиторов PARP.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Достоверность полученных результатов основывается на применении адекватных поставленным задачам современных молекулярно-биологических методов. Исследование проведено на достаточном количестве материала, результаты хорошо проиллюстрированы, осмыслены и подробно обсуждены. Выводы полностью обоснованы совокупностью приведенных данных и соответствуют поставленным задачам. Все результаты работы опубликованы в высокорейтинговых международных и российских журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, а также апробированы на семи конференциях высокого научного уровня.

Оценка содержания диссертационной работы и её завершённости

Диссертационная работа Кургиной Татьяны Андреевны сделана на очень высоком методическом уровне и представляет собой цельное, законченное, очень интересное исследование. Логика работы прекрасно выстроена как на уровне планирования экспериментов, так и на этапе построения плана диссертации. Сначала предлагается новый изящный метод, который позволяет в реальном времени количественно отслеживать динамику связывания с экспериментальным субстратом PARP1 и PARP2, а также динамику реакции PAR-илирования в растворе. Именно создание продуктивной модельной системы лежит в основе красоты всей работы, а также придающей работе практическую ценность, так как подход хорошо показал себя в решении прикладных задач по оценке эффекта ингибиторов PARP – задача, имеющая большое значение для разработки противоопухолевых препаратов. Выводы работы обоснованы и не вызывают сомнений. Более того, несмотря на то, что вся работа проделана в системе *in vitro*, большинство выводов выглядят достаточно универсальными и не зависящими от системы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям. Материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает достаточно полное представление о содержании диссертации. Отсутствие отдельной главы о методологии работы компенсируется детальным описанием методов в соответствующих главах, посвященных результатам работы.

Комментарии, вопросы и замечания к диссертационной работе

Несмотря на то, что вся работа проделана в системе *in vitro*, большинство выводов выглядят достаточно универсальными и не зависящими от системы. Например, выводы о разном поведении PARP1 и PARP2 в одинаковых условиях – различное сродство к одним и тем же субстратам, разный выбор мишеней, разная кинетика реакций. В то же время, для второй части вывода, о том, что «В присутствии HPF1 на нуклеосомах, гистоны становятся основной мишенью модификации PARP2. PARP1 преимущественно катализирует аутомодификацию» было бы уместно подчеркнуть, что этот вывод проверен только для системы *in vitro*, где в реакции присутствуют только два потенциальных субстрата, так как в системе *in vivo* появится множество других потенциальных мишеней PAR-илирования, и на основании результатов работы невозможно судить о том, какой субстрат будет более предпочтителен.

При знакомства с результатами по исследованию соотношения PAR-илирования между PARP1/2 и гистонами, у меня возник вопрос: что происходит с PARP после инициации PAR-илирования? Будет ли сам PARP оставаться связанным с ДНК-активатором? Ведь если после инициации PAR-илирования он будет диссоциировать, то интерпретация соотношения - что и сколько PAR-илируется будет зависеть от относительной концентрации активаторов и PARP? Из текста мне не удалось понять, какое соотношение PARP к ДНК было в эксперименте.

В экспериментальной системе присутствует только два субстрата для PAR-илирования. Когда автор использует термины «авто-PAR-ирование» и «гетеро-PAR-илирование», легко понять, о каком субстрате идет речь, и формулировка «гетеро-PAR-илирование гистонов» кажется мне избыточной, так как модификация чего-то кроме собственно PARP по определению – «гетеро-».

В выводе 1 говорится, что метод позволил исследовать скорость диссоциации комплексов в процессе PAR-илирования. Это важный вывод, и хотелось бы в результатах более четкого акцента на тот эксперимент, в котором именно это исследуется.

Очень интересный результат – доказательство, что в используемой экспериментальной системе положение повреждения ДНК относительно позиции нуклеосомной диады влияет на сайты PAR-илирования гистонов. Методология работы требовала использования последовательности ДНК, очень жестко позиционирующей нуклеосому. Интересно, можно ли предсказать, будет ли сохраняться такая специфичность в случае более подвижных нуклеосом.

В контексте работы было бы интересно обсудить, как зависит стабильность связывания PARP1/2 с ДНК в зависимости от уровня PAR-илирования. Не может ли обнаруженный в работе зависящий от разных параметров баланс между инициацией и элонгацией PAR-илирования отражать механизм регулирования именно стабильности связывания белков с хроматином?

Текст диссертации очень хорошо выстроен как целое, заголовки глав очень информативны, позволяют хорошо видеть общую логику работы. В то же время сам текст местами читается с трудом для специалиста в другой области. Местами не хватает разъяснений. Например, при анализе связывания PARP1/2 определяется параметр EC_{50} , который отражает сродство PARP1 и PARP2 к различным ДНК-активаторам. В главе результаты этот параметр называется «кажущейся константой равновесия», в главе же «материалы и методы» он называется константой диссоциации. Было бы уместно более

подробно описать смысл этой величины, так как она является важной для понимания использованного в работе методологического подхода.

Есть не очень удачные формулировки. Например, абзац начинается словами «ранее данная методика была опробована...». Кажется, что речь идет о работах, сделанных другими авторами, но оказывается, что имеется в виду «сначала...». Не совсем понятно, что означает «масштабирование описанного выше подхода». Встречаются пунктуационные ошибки и опечатки, но их не много.

Смущают знаки препинания при формулировании задачи 4 (и соответствующего вывода 5). Использование здесь тире мешает пониманию связи между словами в предложении.

В формулировке положения, выносимого на защиту: «PARP1 взаимодействует с наиболее высоким сродством с тупыми концами ДНК, в том числе в составе нуклеосом» не понятно, ДНК в составе нуклеосом, или тупые концы должны быть в составе нуклеосом.

В пункте 1.1.2 говорится о «каталитической активации PARP1 и PARP2» но из текста получается, что речь идет об активации каталитической активности фермента, а формулировка подразумевает, что речь идет про активацию с участием какой-то внешней каталитической активности.

Формулировка одного из заголовков: «Функция PAR-илирования в клеточных ответах» является не очень удачной калькой с английского языка.

В таблице 3 не указана единица измерения IC_{50} , только из текста мы узнаем, что это мкМ.

В подписи к рисунку 12 нет упоминания о флюорохромах в составе ДНК-активаторов.

«Величина IC_{50} , отражающая ингибирование связывания PARP1 с тупыми концами» - не удачно построенная фраза, надо было бы указать, ингибирование чем.

На с. 8, в начале главы 1.3 автореферата, написано «ввиду невозможности достоверного определения величин EC_{50} ...», но в главе выше мы видим таблицу с измерениями этого параметра. Без дополнительных пояснений это выглядит как противоречие.

Все перечисленные замечания носят либо редакторский, либо уточняющий характер и не влияют на очень высокую оценку содержания работы, достоверность полученных результатов и сделанных на их основе выводов.

Заключение

Диссертационная работа Кургиной Татьяны Андреевны «Влияние фактора модификации гистонов HPF1 на активность поли(ADP рибоза)полимераз 1 и 2 при взаимодействии с нуклеосомами», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - "молекулярная биология", является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном и методическом уровне, в которой получены новые оригинальные данные, имеющие важное практическое значение. По актуальности, новизне, научной и практической значимости, а также методологическому и методическому уровню полученных результатов рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует критериям 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 наук, а её автор, Кургина Татьяна Андреевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - "молекулярная биология".

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник ИМКБ СО РАН

Доктор биологических наук (03.01.07 - Молекулярная генетика)

Колесникова Татьяна Дмитриевна

E-mail kolesnikova@mcb.nsc.ru

Телефон: +7 9138975812

Адрес места работы:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук» (ИМКБ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,8/2

Телефон: +7 (383) 363-90-42

Факс: +7 (383) 363-90-78

2 ноября 2023 г.

