

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Науменко Константина Николаевича

«Роль РНК-связывающего белка YB-1 в регуляции активности
поли(ADP-рибоза)полимеразы 1»

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

Актуальность темы исследования. Изучение процессов репарации ДНК в настоящее время является одним из перспективных направлений современной биохимии. Это связано, прежде всего, с тем, что нарушения в этих системах, отвечающих за стабильность генетической информации, ведут к ряду патологических процессов, в первую очередь, к процессам злокачественной трансформации. Традиционная терапия онкологических заболеваний направлена на повреждение ДНК онкотрансформированных клеток, и ее результат зависит от эффективности систем их репарации. В настоящее время активно разрабатываются ингибиторы белков репарации ДНК для увеличения чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам. Важной фармакологической мишенью является PARP1, которая рассматривается, как ключевой регулятор процессов метаболизма ДНК в условиях генотоксического стресса. Активируясь при повреждениях ДНК, PARP1 катализирует реакцию поли(ADP-рибозил)ирования – процесс ковалентного присоединения поли(АДФ-рибозы) к белкам-акцепторам. В настоящее время, фармацевтическими компаниями проводятся клинические испытания целого ряда ингибиторов PARP1, а детальное понимание роли этого фермента в репарации ДНК является важной предпосылкой для создания новых подходов для лечения онкологических заболеваний. Многие РНК-связывающие белки рассматриваются как возможные участники поддержания стабильности генома, поскольку их повышенное содержание в

трансформированных клетках часто коррелирует с резистентностью опухолей к радио- и химиотерапии. Кроме того, многие из них являются мишенями поли(ADP-рибозил)ирования или способны взаимодействовать с поли(АДФ-рибозой). Одним из таких РНК-связывающих белков является мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1). Ранее было показано, что YB-1 способен стимулировать активность PARP1 в системе *in vitro*, однако механизм такой стимуляции полностью до конца не установлен. Изучение механизма регуляции активности PARP1 с участием YB-1 является актуальной задачей для понимания роли РНК-связывающих белков в PARP1-зависимой регуляции репарации ДНК.

Научная новизна диссертационной работы Науменко К.Н. не вызывает сомнения. Учитывая тот факт, что роль YB-1 в регуляции активности PARP1 мало исследована, многие результаты были получены, действительно, впервые. В качестве итогового результата авторами предложен детальный механизм регуляции активности PARP1 белком YB-1. Установлено, что YB-1 регулирует активность PARP1 в составе тройного комплекса YB-1•PARP1•ДНК или через взаимодействие YB-1 с автополи(ADP-рибозил)ированной формой PARP1. Выступая в качестве эффективного акцептора в реакции поли(ADP-рибозил)ирования, YB-1 повышает число оборотов реакции, катализируемой PARP1 и увеличивает общий выход реакции поли(ADP-рибозил)ирования. Проведенное исследование позволяет глубже понять молекулярный механизм регуляции активности PARP1 в присутствии ДНК- и PAR-связывающих белков.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационной работы Науменко К.Н. могут представлять интерес, как для фундаментальной, так и прикладной науки. Данные, устанавливающие механизм регуляции активности PARP1 белком YB-1 могут иметь место и в случае других РНК-связывающих белков для которых уже установлено их поли(ADP-рибозил)ирование и/или взаимодействие с поли(ADP-рибозой). Результаты диссертационной работы имеют также и практическое значение,

так как YB-1 можно рассматривать как одну из мишеней в разработке стратегии преодоления химиорезистентности клеток опухолей при лечении онкологических заболеваний.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Науменко К.Н. изложена на 120 страницах машинописного текста и содержит 34 рисунка и 6 таблиц. Она включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, выводы, список цитируемой литературы, состоящий из 236 источников. Приложение к диссертации на 5 страницах содержит 4 рисунка.

Во введении автор обосновано представляет актуальность выбранного исследования, на основании чего четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен объектам исследования: поли(ADP-рибоза)полимеразе 1 и мультифункциональному Y-box-связывающему белку 1. В части обзора, посвященной PARP1, подробно описывается структура данного фермента, метаболизм продукта реакции поли(ADP-рибозы). Большое внимание уделено описанию имеющихся данных о роли PARP1 в репарации ДНК и регуляции её активности ДНК- и РНК-связывающими белками. В части обзора, посвященной YB-1, содержится описание структуры белка и краткое описание роли YB-1 в клеточных процессах, рассмотрена роль YB-1 как онкогена. В целом, в обзоре, представлены необходимые современные данные по исследуемой проблеме.

Материалы и методы исследования адекватны поставленной цели и решаемым задачам. В работе использован набор современных биохимических методов с использованием рекомбинантных аналогов белков человека и модельных ДНК-структур, имитирующих поврежденную ДНК. В работе проводилось выделение и очистка большого количества рекомбинантных белков, конструкции для наработки которых были получены автором самостоятельно. Использовалось электрофоретическое

разделение белков и олигонуклеотидов, использовался метод задержки в геле, флуоресцентное титрование.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из пяти частей, где последовательно приводятся экспериментальные данные о роли YB-1 в регуляции реакции поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой PARP1. В первой и второй части результатов автор приводит данные о стимуляции активности PARP1 белком YB-1 с использованием большого количества модельных ДНК-субстратов, а также в присутствии известных кофакторов реакции поли(ADP-рибозил)ирования и ингибиторов активности PARP1. В третьей части автор детально изучает механизм стимуляции активности PARP1 с использованием делеционных мутантов YB-1. В этой части установлено, что С-концевой домен YB-1 является ключевым доменом для стимуляции активности PARP1. В четвертой и пятой частях автор детально изучает взаимодействие белков YB-1 и PARP1, опосредованное поврежденной ДНК и поли(ADP-рибозой).

В разделе «Заключение», на основании всех экспериментальных данных, подводится итог исследования в виде описания механизма стимуляции реакции поли(ADP-рибозил)ирования.

В разделе «Выводы» приведены четыре утверждения, которые являются обоснованными и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 6-ти всероссийских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и дает представление об основных разделах работы и полученных результатов.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Науменко К.Н. у меня нет. При ее прочтении у меня появились небольшие замечания и вопросы для научной дискуссии:

1) Из данных на рисунке 2, не представляется возможным увидеть возможное поли(ADP-рибозил)ирование гистонов, поскольку нижний маркер молекулярной массы соответствует 28 кДа, тогда как гистоны обладают меньшей молекулярной массой.

2) На рисунке 16 не приведены данные визуализации PARP1^{G972R} методом атомно-силовой микроскопии.

3) В тексте есть неудачные выражения, иногда затрудняющие понимание смысла: на стр. 12 можно прочесть: «Активируясь на повреждениях ДНК и используя в качестве субстрата NAD⁺, PARP1 и PARP2 катализируют синтез полимера ADP-рибозы»; на стр. 98 «... мутанты PARP1»; на стр. 25: «Предположение о том, что аутомодификация PARP1 происходит межмолекулярно в ассиметричном димере двух полипептидов PARP1, согласуется со способностью PARP1 ковалентно модифицировать другие белки».

4) Возник вопрос дискуссионного характера: Оценка влияния YB-1(FL) на активность мутантов PARP1 проводилась в искусственной системе, возможно ли провести такую оценку *in vivo*?

Все указанные замечания не снижают значимости диссертационной работы и моей высокой оценки выполненного исследования.

Заключение. Работа Науменко К.Н. соответствует требованиям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, соискатель Науменко Константин Николаевич заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 — “молекулярная биология”.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной
медицины»

доктор биологических наук, профессор

Гуляева Людмила
Федоровна

Дата: «30» мая 2023 г.

Контактные данные:

тел.: +7(913)9161272, e-mail: lfgulyaeva@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.01.03 – Молекулярная биология и 03.01.04 – Биохимия.

Адрес места работы:

630117, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12, тел. 8(383)334-88-40

Подпись д.б.н., профессора Л.Ф. Гуляевой

Заверяю:

Начальник Отдела кадров

Минеева О.М.



Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины»

Дата: «30» мая 2023 г.