

ОТЗЫВ

официального оппонента Лябина Дмитрия Николаевича 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

Диссертационная работа К.Н. Науменко посвящена исследованию роли белка YB-1 в регуляции активности одного из ключевых белков-регуляторов репарации ДНК – поли(ADP-рибоза)полимеразы 1.

Актуальность диссертационного исследования

Репарация ДНК наряду с репликацией ДНК является ключевым клеточным процессом, обеспечивающим генетическую стабильность. Знание механизмов репарации ДНК крайне важно с точки зрения разработки новых эффективных стратегий лечения онкологических заболеваний, поскольку именно преодоление чрезвычайно активной системы репарации ДНК в раковых клетках необходимо для успешной терапии онкозаболеваний ДНК-повреждающими ксенобиотиками. Одним из ключевых регуляторов репарации ДНК является поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1) – белок, непосредственно вовлеченный в детекцию разрывов ДНК и рекрутированию других компонентов системы репарации за счет синтеза поли(АДФ-рибозы) в районе сайта повреждения ДНК. Так как PARP1 играет множество ролей в клетке, определение и изучение белков, влияющих на активность PARP1 и синтез поли(АДФ-рибозы) в ответ на генотоксический стресс, является важной задачей в современной биологии. Одному из белков, регулирующих активность PARP1, Y-бокс-связывающему белку 1 и посвящена работа Константина Николаевича Науменко. И если ранее были установлены и количественно охарактеризованы белок-белковые взаимодействия YB-1 с PARP1 и была показана способность YB-1 модулировать каталитическую активность PARP1, то механизм стимуляции активности PARP1 белком YB-1 оставался невыясненным.

Таким образом, тема диссертационной работы К.Н. Науменко «Роль РНК-связывающего белка YB-1 в регуляции активности поли(ADP-рибоза)полимеразы 1» обладает несомненной актуальностью и представляет большой интерес для понимания роли РНК-связывающих белков в PARP1-зависимой регуляции стабильности генома, что имеет значение не только для

фундаментальной науки, но и, в перспективе, для медицины, ветеринарии и сельского хозяйства.

Структура работы

Материал диссертации изложен на 120 страницах машинописного текста, который включает в себя 34 рисунка и 6 таблиц, а также на 5 страницах Приложения, содержащего 4 рисунка. Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями к оформлению работ и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», который содержит 236 ссылок.

Научная новизна и практическая значимость работы

Диссертационная работа Константина Николаевича Науменко является первым детальным исследованием механизма влияния РНК-связывающего белка YB-1 на активность PARP1. Автором установлено, что YB-1 способен регулировать активность PARP1 посредством формирования тройного комплекса YB-1•PARP1•ДНК, а также через взаимодействие YB-1 с автополи(ADP-рибозил)ированной формой PARP1. Проведенное исследование позволяет глубже понять молекулярный механизм регуляции активности PARP1 в присутствии белков, которые способны взаимодействовать как с повреждённой ДНК, так и поли(ADP-рибозой), формирующейся в процессе активации PARP1. Интересны также данные подтверждающие гипотезу «PAR-кода» для белков, принимающих участие в репарации ДНК. Непосредственное участие онкобелка YB-1 в регуляции активности фермента PARP1, ключевого фактора репарации ДНК, может играть важную роль в выживаемости злокачественно трансформированных клеток в условиях химио- или радиотерапии. Результаты, полученные в данной работе, могут иметь важное практическое значение для понимания механизмов развития резистентности клеток опухолей, а также создания новых методов в терапии онкологических заболеваний.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Положения, сформулированные в диссертации Константина Николаевича Науменко, основаны на большом объеме фактического материала. Выводы полностью обоснованы совокупностью приведенных данных. Статистическая

обработка экспериментальных данных адекватна, их достоверность не вызывает сомнений.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Диссертационная работа Константина Николаевич Науменко по своей структуре и качеству изложения материала соответствует самым высоким стандартам. Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы, Здесь же обосновывается ее актуальность, теоретическая и практическая значимость. Обзор литературы посвящен двум объектам исследования: поли(АДФ-рибоза)полимеразе 1 (PARP1) и Y-бокс-связывающему белку 1. Наибольшее внимание уделено структуре PARP1, катализируемой ею ферментативной реакции и регуляции активности PARP1. Часть обзора, посвященная YB-1 написана лаконично, но при этом информативна. Иллюстративный материал в достаточной степени способствует пониманию описываемого материала.

Раздел «Материалы и методы исследования» содержит описание использованных в работе материалов, а также 22 подраздела с подробным описанием примененных автором методик, которые полностью соответствует поставленным экспериментальным задачам.

В разделе «Результаты и их обсуждение» автор представляет полученные данные и сопровождает их достаточно развернутым и доходчивым обсуждением. Несомненным плюсом этого раздела является то, что автор после каждого подраздела или пункта делает краткий вывод из результатов проведенного эксперимента. Это в значительной мере упрощает понимание логики работы. Необходимо отметить высокое экспериментальное мастерство, проявленное автором при выполнении диссертационной работы, а также большой объем выполненных экспериментов. В разделе «Заключение» диссертант коротко суммирует полученную информацию и подводит итоги исследования. Раздел «Выводы» содержит 4 утверждения, все из которых не вызывают серьезных нареканий.

Важно отметить, что количество ошибок и опечаток в рукописи крайне мало (они фактически отсутствуют), что облегчает чтение диссертации.

В целом после прочтения рукописи не остается сомнений в научной значимости диссертационной работы, а также в ее потенциальной пользе для будущих фундаментальных и прикладных исследований.

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 исчерпывающее представление о содержании диссертации и степени участия автора в исследованиях.

Замечания к диссертационной работе

Замечания к разделу «Обзор литературы»

К этому разделу имеются следующие незначительные замечания:

1. Как верно отмечает автор в своей работе, «функции PARP и поли(ADP-рибозил)ирования многогранны», однако в обзоре литературе практически всё внимание уделено структуре PARP, её ферментативной активности и регуляции этой активности и лишь вскользь упомянуты функции, особенно те, что не связаны с репарацией ДНК. Кроме того, можно было уделить немного больше внимания роли PARP в жизнедеятельности раковых клеток, в старении и т.п.. Иными словами, упомянутую автором «многогранность» функций PARP следовало бы подкрепить несколькими наиболее яркими примерами.
2. При описании структуры PARP упоминается BRCT-домен, однако не расшифровывается эта аббревиатура, и не говорится что в нем примечательного, для каких белков еще характерен этот домен. То же относится к «высококонсервативной последовательности «PARP signature»» в каталитическом домене PARP. Если автор её упомянул, то хотелось бы знать, в чём её особенность, уникальность и зачем она нужна.
3. В описании функций белка YB-1 в трансляции (стр. 35-36) упомянуты соотношения $YB-1/mRNA > 1$ и $YB-1/mRNA < 1$. Это не верно. В данном случае речь должна идти о высоком и низком соотношении YB-1/mRNA (по молям).

Основные замечания к разделу «Результаты и обсуждения»

1. Возможно, было бы уместно сопоставить результаты, представленные на рисунке 3.5. («Исследование комплексообразования PARP1 и YB-1 с нуклеосомной ДНК и мононуклеосомой методом анизотропии флуоресценции») с результатами анализа поли(ADP-рибозил)ирования белков во временном разрешении методом SDS-гель-электрофореза

(такого рисунка в работе нет). Если в во втором эксперименте отдельно построить кривые поли(ADP-рибозил)ирования PARP и YB-1, то можно было ответить на следующий вопрос: задержка освобождения ДНК из комплекса вызвана замедлением реакции поли(ADP-рибозил)ирования PARP или это YB-1 каким-то образом удерживает на ДНК уже поли(ADP-рибозил)ированную PARP.

2. Любопытно, что согласно рисунку 3.9. фрагмент YB-1 1-219 стимулирует активность PARP1, как и полноразмерный белок. Однако фрагмент YB-1(Δ 1-2), который на 11 аминокислотных остатков длиннее, таким свойством уже не обладает. Чем можно объяснить данный факт?
3. Пожалуй, единственное не вполне убедительное место в работе – это часть, касающаяся доказательств формирования тройного комплекса ДНК–PARP–YB-1. По рисунку 3.12. трудно судить об образовании такого комплекса. На гель-шифте (3.12.Б) видно, что и в отсутствие YB-1 (дорожка 9) образуется комплекс PARP1–ДНК с такой же электрофоретической подвижностью, что и предполагаемый тройной комплекс ДНК–PARP–YB-1 (дорожки 10-14). Более того, такую же подвижность имеет и комплекс YB-1–ДНК в высоких концентрациях YB-1. Если предположить, что гомодимер PARP1 образует комплекс с ДНК, то после добавления YB-1 может образовываться гетеродимерный комплекс YB-1-PARP1 на ДНК, с большей электрофоретической подвижностью. Дело осложняется тем, что на молекуле ДНК, судя по гель-шифту, присутствует несколько молекул белка YB-1. Таким образом, определить что указанный комплекс содержит и YB-1, и PARP из этого эксперимента, на мой взгляд, невозможно. Доказать присутствие и YB-1, и PARP1 можно было путем переноса комплексов из геля его на мембрану с последующей детекцией белков антителами против YB-1 и PARP.
4. Эксперимент с использованием метода измерения анизотропии флюоресценции (3.12.А) также не позволяет подтвердить формирование тройного комплекса. Сам рост анизотропии в присутствии YB-1 не удивителен, поскольку в реакционной смеси было еще достаточно свободной ДНК, с которой мог связаться YB-1. Изменение же угла наклона кривой в случае наличия в смеси помимо YB-1 и ДНК еще и PARP1 может говорить, например, даже о затруднении связывания YB-1 с ДНК в присутствии PARP1, что противоречит рисунку 3.12.Б, на

котором можно видеть, что в присутствии PARP1 связывание YB-1 с ДНК несколько усиливается (видно по низкомолекулярным комплексам).

Впрочем, по косвенным данным (рисунки 3.14. и 3.15.), а также исходя из общих соображений о функционировании PARP1, формирование тройного комплекса на начальных этапах реакции поли(ADP-рибозил)ирования наиболее вероятно.

5. Вызывает некоторую настороженность утверждение о том, что YB-1 является преимущественной мишенью поли(ADP-рибозил)ирования, поскольку практически во всех экспериментах использовался значительный (от 8 до 16 раз) избыток YB-1 по сравнению с PARP. В таких условиях трудно быть не преимущественной мишенью.
6. Интересно, что согласно эксперименту с мутантом PARP1 (E988K) YB-1 не стимулирует моно(ADP-рибозил)ирование PARP1 (Рис. 3.15.). При этом поли(ADP-рибозил)ирование PARP1 YB-1 стимулирует (многие другие рисунки). Объяснение этого факта могло бы, вероятно, помочь в описании механизма регуляторного влияния YB-1 на PARP1.
7. В качестве предложения для будущих исследований. Согласно данным из вашей лаборатории PARP1 и YB-1 могут непосредственно взаимодействовать. Для дальнейшего исследования механизма регуляции активности PARP1 белком YB-1, необходимо, вероятно, выяснить, с каким доменом PARP1 взаимодействует YB-1, а также сосредоточиться, как уже было упомянуто выше, на доказательстве формирования тройного комплекса PARP-ДНК-YB-1.

минорные замечания к разделу «Результаты и обсуждения»:

1. К рисунку 3.3 возможно был бы уместен контроль без добавления ДНК. Это позволило бы читателю убедиться в том, что активна или не активна PARP в отсутствие ДНК вообще и стимулирует ли одноцепочечная ДНК (ss32) активность PARP.
2. На рисунке 3.2. в подписи перепутаны ссылки на панели А и Б (должно быть «в отсутствие (А) и в присутствии (Б)»), а на панели В нет подписи оси у.
3. Отсутствует оценка статистической значимости наблюдаемых различий во всех экспериментах. И хотя в большинстве случаев это не имеет принципиального значения, в ряде экспериментов (Рис. 3.4, Рис. 3.9.) это сделать было необходимо.

Такое обилие вопросов к диссертационной работе Константина Николаевича Наumenко ни в коем случае не умаляет её научную значимость, поскольку все замечания носят уточняющий характер или диктуются желанием рецензента узнать еще больше о предмете исследования и его будущем.

Заключение

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Наumenко Константина Николаевича полностью отвечает требованиям 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. Таким образом, Наumenко Константин Николаевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология».

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на межлабораторном семинаре группы регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук.

Д.б.н., старший научный
сотрудник группы регуляции
биосинтеза белка Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт белка
Российской академии наук

Лябин Дмитрий Николаевич

29 мая 2023 г.

Лябин

Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 4, 142290

ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
3 АВ. КАНЦЕЛЯРИЕЙ
ИБ РАН
АКСЕНОВА Г.Н.
29.05.2023г.

