

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Науменко Константина Николаевича на тему: «Роль РНК-связывающего белка YB-1 в регуляции активности поли(ADP-рибоза)полимеразы 1» по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.

Тема работы автора диссертации связана с одним из наиболее активно развивающихся в настоящее время направлений исследований в области естественных наук – изучением молекулярных механизмов репарации ДНК. Помимо чисто научного интереса, существенную значимость данному направлению придаёт его очевидный практический потенциал для разработки новых эффективных стратегий лечения онкологических заболеваний. На сегодняшний день стратегия противоопухолевой терапии направлена прежде всего на повреждение ДНК в онкотрансформированных клетках. При этом, клеточные процессы репарации ДНК способны устранять такие повреждения, вызванные терапевтическими агентами, что обеспечивает устойчивость опухолевых клеток к терапии. Поэтому знания о механизмах репарации ДНК, позволяющие разрабатывать подходы к управлению процессами исправления повреждений ДНК, остро необходимы для разработки новых подходов в борьбе с онкологическими заболеваниями. Одним из ключевых регуляторов процессов репарации ДНК является поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1) – фермент, обеспечивающий синтез поли(ADP-рибозы) (PAR) в районе сайта повреждения ДНК. Другим белком, активно вовлечённым в поддержание стабильности генома, является мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1), который способен стимулировать каталитическую активность PARP1, однако механизм такой стимуляции остаётся невыясненным. Таким образом, изучение механизма регуляции активности PARP1 с участием YB-1 является актуальной задачей и представляет большой интерес для понимания роли РНК-связывающих белков в PARP1-зависимой регуляции стабильности генома. С учётом сказанного выше актуальность темы диссертации бесспорна.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

В данной работе впервые детально исследован механизм влияния РНК-связывающего белка YB-1 на активность фермента PARP1. Показано, что белок YB-1 может регулировать активность PARP1 в составе тройного комплекса YB-1•PARP1•ДНК или через взаимодействие YB-1 с автополи(ADP-рибозил)ированной формой PARP1. Выполненное исследование даёт подробное представление о молекулярном механизме регуляции активности PARP1 в области повреждения ДНК в присутствии белков, которые способны взаимодействовать как самой ДНК, так и синтезируемой в процессе активации PARP1 поли(ADP-рибозой).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Значимость диссертации состоит в том, что автором экспериментально установлен молекулярный механизм, вовлекающий белок YB-1 в регуляцию каталитической активности PARP1. Полученные в данной работе результаты имеют важное практическое значение для понимания механизмов развития резистентности клеток опухоли к химио- или радиотерапии, поскольку показанное в работе участие YB-1 в регуляции активности фермента PARP1 выявляет его важную роль в выживаемости злокачественно трансформированных клеток. Поэтому данная работа, несомненно, имеет большую значимость не только в научных исследованиях, но и для медицины.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ.

Работа написана по традиционной схеме, содержит разделы “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы исследования”, “Результаты и их обсуждение”, “Заключение” и “Выводы” и изложена на 120 страницах. Диссертация проиллюстрирована 34 рисунками и включает 6 таблиц; список цитируемой литературы насчитывает 236 источников. Приложение к диссертации на 5 страницах содержит 4 рисунка.

В разделе “Введение” в краткой форме кратко изложены актуальность работы, цель и задачи исследования, научная новизна полученных результатов и практическая значимость работы. Здесь же приводятся положения, выносимые на защиту, даётся информация об апробации работы, количестве

публикаций, включающем 5 статей по теме диссертации и 6 тезисов конференций, а также личном вкладе автора.

Глава “Обзор литературы” посвящена рассмотрению функций и механизма действия полимеразы PARP1 и её взаимодействий с РНК-связывающими белками. В этой части работы автор даёт подробное описание имеющихся на сегодняшний день представлений о структуре данного фермента и механизме реакции поли(ADP-рибозил)ирования, подробно освещаются современные знания о ДНК-зависимом синтезе поли(ADP-рибозы) и известных регуляторах PARP1 – ДНК- и РНК-связывающих белках. Отдельная часть обзора посвящена описанию структуры и функциональных свойств белка YB-1. В целом, обзор хорошо написан, достаточно информативен, хорошо структурирован и иллюстрирован, что помогает глубже понять суть изучаемых в диссертации вопросов.

Глава “Материалы и методы” содержит подробное описание реагентов и методов, использованных автором в своей работе. В этом разделе автор приводит пунктуальное описание большого числа разнообразных методик, из чего можно заключить, что он действительно мастерски владеет техникой эксперимента по теме своей работы. Кроме того, такое детальное представление экспериментальных процедур позволяет при желании их легко воспроизвести или использовать в качестве лабораторного протокола.

Наибольшее место в диссертации занимает глава “Результаты и обсуждение”, состоящая на 5 частей, в которой автор приводит непосредственно описание полученных данных и делает по ним соответствующие заключения.

В первой части результатов автор в ряде экспериментов убедительно показывает, что белок YB-1 является фактором, стимулирующим активность PARP1, причём эта активность проявляется как в присутствии нуклеосомной ДНК, так и, что важно, в присутствии ДНК, содержащей различные повреждения. Далее, во второй части, автор сравнивает влияние различных кофакторов на активность фермента и показывает, что стимулирующий эффект YB-1 на активность PARP1 сопоставим по силе с эффектом коровых гистонов или спермина, хотя и уступает эффектам гистона H1 или ионам Mg^{2+} ,

однако, в отличие от гистонов, YB-1 более эффективен в реакции трансмодификации. Здесь же автор демонстрирует снижение эффективности ингибиторов активности PARP1 3-аминобензамида и олапариба в присутствии YB-1. Развивая свои исследования, в третьей части главы “Результаты и обсуждения” автор получает мутантные формы YB-1, частично лишённые С-концевых неупорядоченных доменов, содержащих кластеры положительно заряженных аминокислот, и показывает, что последовательное укорочение С-концевого домена приводит к снижению сродства YB-1 к поврежденной ДНК и PAR. Четвёртая часть главы посвящена исследованиям взаимодействия YB-1 и PARP1, опосредованного поврежденной ДНК. Здесь, применяя методы анизотропии флуоресценции и задержки в геле, автор определяет, что YB-1 и PARP1 образуют гетеромерный комплекс на поврежденной ДНК, и что в составе этого комплекса YB-1 является преимущественной мишенью поли(ADP-рибозил)ирования. В этом случае, кластеры положительно заряженных аминокислот в С-концевом домене YB-1 также играют важную роль во взаимодействии с поврежденной ДНК. В заключительной пятой части рассматриваемой главы автор описывает результаты исследования, относящегося к изучению непосредственно взаимодействия белков YB-1 и PARP1, опосредованного PAR. Используя ряд методов, в том числе метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), позволяющий наблюдать морфологию структуры макромолекулярных комплексов, автор показывает, что YB-1 при взаимодействии с PAR в процессе авто-поли(ADP-рибозил)ирования самого PARP1 способен ингибировать элонгацию цепи. Кроме того, применение метода АСМ позволило показать, что сама структура синтезируемого полимера PAR, в частности его длина и количество точек ветвления, может влиять на YB-1-зависимую стимуляцию PARP1, приводя к перераспределению между уровнями авто- и транс-поли(ADP-рибозил)ирования белков. На основании полученных результатов, автор предлагает молекулярный механизм стимуляции активности PARP1 в присутствии белка YB-1, заключающийся в том, что YB-1, выступая в качестве основного акцептора PAR, удаляет PAR – продукт реакции на этапе диссоциации YB-1 из комплекса с PARP1 и повреждённой ДНК, что приводит

к увеличению числа оборотов и стимуляции процесса поли(ADP-рибозил)ирования. При этом, поли(ADP-рибозил)ирование YB-1 ограничивает элонгацию растущего полимера PAR, что позволяет приходящим из раствора молекулам YB-1 локализоваться вблизи активного центра PARP1, многократно повторяя цикл ассоциации-модификации-диссоциации.

На основании полученных результатов автором сформулированы 4 вывода, которые выглядят вполне обоснованными и соответствуют всем достижениям данной диссертационной работы. Основные результаты работы автора опубликованы в 5 статьях в отечественных и международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus и, и представлены в виде докладов на 6 конференциях. Всё это указывает на живой интерес научного сообщества к полученным результатам и их исключительной значимости как для дальнейшего развития исследований в данной области, так и для медицины.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ.

Хотя диссертационная работа Науменко Константина Николаевича выполнена на высочайшем научном уровне и в ней получены действительно весомые и значимые научные результаты, следует отметить ряд замечаний по тексту диссертации.

В частности, название обзора литературы (“Функции и механизм действия PARP1 и её взаимодействие с РНК-связывающими белками”) не совсем точно отражает его содержание, поскольку в этой главе присутствует также раздел, посвящённый структурно-функциональной организации РНК-связывающего белка YB-1 (раздел 1.3). В ряде мест текста диссертации присутствует жаргон, например “количественная обработка гелей” (стр.47). Также встречаются различные неточности, например параллельное употребление англоязычной и русскоязычной аббревиатуры одних и тех же соединений (см. АДФ (стр. 59, 81 и др.) и ADP (стр. 59 и др.)) или спермин³⁺, соль которого вообще-то является тетрагидрохлоридом.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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:

зав. Лабораторией структуры и функции рибосом ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»

доктор химических наук, доцент



Малыгин Алексей Аркадьевич

Контактные данные:

тел.: +7(913)7104041, e-mail: malygin@niboch.nsc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена

диссертация: 03.01.04 – биохимия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 8,

ИХБФМ СО РАН, Лаборатория структуры и функции рибосом

Тел.: +8(383)363-51-39; e-mail: malygin@niboch.nsc.ru

Подпись сотрудника ИХБФМ СО РАН Малыгина А.А.

заверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.б.н.



Логашенко Е.Б.