

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук Украинцева Александра Андреевича на тему: «Роль белков PARP1, PARP2 и PARP3 в регуляции активности ферментов BER на нуклеосоме и в стабилизации её структуры» по специальности 1.4.9 – «биоорганическая химия»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.

Вопросы поддержания стабильности генома являются центральными для современной молекулярной биологии и биохимии. Это определяет актуальность всестороннего изучения механизмов репарации ДНК. Ключевую роль в системе репарации играют ферменты семейства поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP) PARP1, PARP2 и PARP3 — катализаторы поли(ADP-рибозил)ирования белков-мишеней. Известно, что они выступают в роли молекулярных сенсоров повреждений ДНК и организаторов сборки репарационных комплексов. Однако, многие аспекты их функционирования, включая функциональную избыточность, специфичность и кооперативность, изучены недостаточно.

В последние годы актуальность фундаментальных исследований в области биохимии белков PARP многократно возросла в связи с их успешной валидацией в качестве мишеней для таргетной противоопухолевой терапии. Ингибиторы PARP показали высокую эффективность в лечении онкологических заболеваний, ассоциированных с дефектами в системе гомологичной рекомбинации (например, при мутациях в генах *BRCA1/BRCA2*). Несколько препаратов этого класса уже одобрены для клинического применения, хотя и имеют ограничения, что стимулирует дальнейший поиск селективных ингибиторов, а также уточнение функций всех членов семейства PARP.

До публикации материалов диссертационного исследования лишь для мажорного представителя семейства (PARP1) специфичность к повреждениям ДНК и влияние на активность ключевых ферментов системы эксцизионной репарации (BER) были описаны сравнительно полно. Соответствие этого

описания функционированию PARP в контексте хроматина оставалось открытым вопросом, т.к. ключевые закономерности были установлены на свободной ДНК. Между тем, нуклеосомная укладка существенно затрудняет доступ репарационных ферментов к повреждениям.

Прояснение молекулярных основ функционирования PARP в контексте хроматина имеет принципиальное значение для раскрытия механизмов реорганизации хроматина в месте повреждения ДНК и эпигенетической регуляции репарационных процессов. Кроме того, оно позволит точнее установить приоритетные терапевтические мишени, отобрать наиболее перспективные ингибиторы PARP и протестировать их *in vitro* в условиях, максимально приближенных к физиологическим, что обуславливает актуальность диссертационной работы для фармакологии и медицины.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

Научная новизна диссертационной работы заключается в следующем:

- 1) Впервые проведено систематическое сравнительное исследование влияния PARP1, PARP2 и реакции поли(ADP-рибозил)ирования на каталитическую активность ключевых ферментов BER (AP-эндонуклеазы 1, APE1; полимеразы β , Pol β ; ДНК-лигазы III α , LigIII α) в минимальной модели хроматина с повреждением ДНК. Полученные данные подтверждают и дополняют закономерности регуляции репарации, установленные ранее на свободной ДНК.
- 2) Впервые обнаружена и охарактеризована способность PARP3 специфически взаимодействовать с апуриновыми/апиридиновыми сайтами (AP-сайтами) в структуре нуклеосом. Это открытие указывает на самостоятельную роль PARP3 в инициации репарации повреждений ДНК в хроматине, выходящую за рамки его известных функций, а именно вклада в ответ на двуцепочечные разрывы.
- 3) Впервые выполнен комплексный анализ воздействия всех трёх белков PARP (PARP1, PARP2, PARP3) на структурную организацию и стабильность нуклеосомы. Установлено, что PARP3, в отличие от PARP1 и PARP2, способствует компактизации хроматина и

стабилизации нуклеосомной структуры. Это выявляет его новую, неканоническую функцию в реорганизации хроматина при репарации.

Таким образом, работа носит фундаментальный характер, и новизна полученных диссертантом результатов неоспорима. Эти результаты существенно углубляют представления о механизмах функционирования белков семейства PARP в контексте хроматина.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Значимость проведённого исследования проявляется как в фундаментально-теоретической, так и в прикладной плоскостях.

Теоретическая значимость состоит в получении новых знаний о регуляции репарации ДНК в клетке. Работа служит «мостом» между исследованиями *in vitro* на модельных субстратах (свободная ДНК) и исследованиями на клеточных культурах. Первые опираются на классические методы оценки сродства связывания и ферментативной активности; они позволяют детально охарактеризовать вклады и взаимовлияние компонентов системы репарации. Исследования второго типа опираются на высокопроизводительные технологии и методы иммунопреципитации; они позволяют отследить ассоциации факторов репарации с повреждениями ДНК на полногеномном уровне в нативных условиях. В диссертационном исследовании преимущества работы на модельных субстратах сочетаются с имитацией нативных условий. Это позволило, во-первых, доказать релевантность данных, полученных ранее на свободной ДНК, во-вторых, выявить принципиально новую специфику взаимодействия PARP1, PARP2 и PARP3 с нуклеосомами. Ключевым достижением представляется пересмотр роли PARP3, который предстает не как вспомогательный белок, а как ключевой участник распознавания повреждений и стабилизации хроматина. Эти результаты вносят существенный вклад в современную парадигму поддержания целостности генома.

Практическая значимость работы напрямую вытекает из её фундаментальных выводов. Детальное понимание функций белков PARP, и в особенности выявление уникальной роли PARP3, создает научный задел для:

- разработки высокоселективных ингибиторов нового поколения, нацеленных на конкретные представители семейства PARP, что является актуальной задачей современной фармакологии и может способствовать прогрессу в области противоопухолевой терапии;
- выявления новых прогностических биомаркеров (маркеров ответа на противоопухолевую терапию или прогрессирования заболевания), что значимо для развития персонализированной медицины.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ.

Диссертационная работа структурно оформлена традиционно. Она включает следующие обязательные разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Общий объём основного текста диссертации составляет 146 страниц. Изложение материала подкреплено 55 рисунками и 8 таблицами, которые наглядно иллюстрируют полученные результаты и облегчают их восприятие. Список литературы включает 286 источников; в нем преобладают современные работы в международных рецензируемых журналах, что указывает на глубокую проработку темы и знакомство автора с последними достижениями в данной области. Дополнительные материалы, вынесенные в Приложение на 17 страницах (15 рисунков и 7 таблиц), содержат важные вспомогательные и контрольные данные, подтверждающие основную часть работы и демонстрирующие тщательность и объем проведённого экспериментального исследования.

В разделе «Введение» автор кратко очерчивает предмет исследования. В разделе вводятся основные понятия и формируется исчерпывающая концептуальная база для всего последующего изложения. Лаконично раскрыта актуальность работы, сформулированы конкретная цель и

последовательный перечень задач, решение которых обеспечивает достижение этой цели. Особо следует отметить, что в разделе чётко и недвусмысленно прописаны элементы научной новизны и теоретической и практической значимости работы, что сразу задаёт высокую планку для её оценки. Здесь же представлены научные положения, выносимые на защиту, которые носят конкретный, доказательный и проверяемый характер, полностью соответствующий содержанию диссертации. Соответствие работы формальным требованиям подтверждается наличием информации о её апробации: представлении на авторитетных научных конференциях. Достоверность полученных результатов подкреплена сведениями о публикационной активности: по материалам диссертации опубликовано 4 научные статьи в рецензируемых изданиях, что полностью удовлетворяет критериям Высшей аттестационной комиссии. В разделе также отражён личный вклад автора во все этапы исследования, что свидетельствует о его высокой квалификации и самостоятельности.

Раздел «Обзор литературы» представляет собой глубокое и систематизированное аналитическое исследование, полностью охватывающее предметное поле диссертации. Его структура, состоящая из пяти взаимосвязанных тематических блоков, логически подводит читателя к обоснованию целей и задач работы. В первой половине обзора автор описывает современные данные о фундаментальных свойствах объектов исследования: детально рассматривается организация и динамика нуклеосом, а также комплексное влияние повреждений ДНК (AP-сайтов) на структуру нуклеосом и функционирование ферментов BER на нуклеосоме. Это создает прочный теоретический фундамент. Далее детально рассмотрены белки PARP1, PARP2 и PARP3, их общепризнанные и дискутируемые функции в качестве сенсоров повреждений и регуляторов репарации. Особую ценность представляет раздел, посвященный применению атомно-силовой микроскопии (АСМ). Автор не просто описывает метод, а проводит критический анализ его возможностей и ограничений применительно к изучению нуклеопротеиновых комплексов, что крайне полезно для последующей интерпретации экспериментальных данных и демонстрирует

методическую зрелость автора. Таким образом, обзор литературы является не формальным отчётом, а результатом аналитической работы, доказательно обосновывающим гипотезу исследования и выбор методологических подходов.

Раздел «Материалы и методы» отличается исключительной детализацией и методологической строгостью. В нём представлен исчерпывающий перечень использованных химических реагентов, биохимических субстратов и коммерческих наборов, что свидетельствует о высоком уровне планирования экспериментов. Автор обоснованно пользуется широким спектром современных экспериментальных подходов, которые удачно дополняют друг друга. Детально и систематично изложены протоколы синтеза и сайт-специфичного мечения олигонуклеотидов, методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и препаративного электрофореза для очистки ДНК, а также комплексная методика реконструирования нуклеосом *in vitro* из рекомбинантных гистонов и очищенных ДНК-матриц. Особого внимания заслуживает скрупулёзное описание методов изучения белок-нуклеиновых и белок-белковых взаимодействий: электрофоретического анализа подвижности ДНК-белковых комплексов (EMSA), методов ферментативного анализа *in vitro* с использованием реконструированных нуклеосом в качестве субстратов, а также применения АСМ для изучения структуры нуклеосомных комплексов. Отдельно приведены детальные протоколы проведения реакций поли(ADP-рибозил)ирования и анализа их продуктов. Столь тщательное и всестороннее описание методологической базы исследования не оставляет сомнений в высоком профессиональном уровне автора и том, что он владеет всем арсеналом использованных методик. Таким образом, изложение материала в данном разделе соответствует высшим стандартам научной деятельности и не оставляет сомнений в достоверности представленных результатов.

Раздел «Результаты и их обсуждение», включающий девять взаимосвязанных подразделов, представляет собой комплексное и логически выстроенное изложение экспериментальных данных, что демонстрирует

высокий уровень научной культуры автора. Методологически исследование выстроено безупречно: от характеристики фундаментальных параметров взаимодействия (определение констант связывания PARP1/2 с нуклеосомами, несущими сайт-специфичные повреждения, методами флуоресцентной анизотропии и EMSA) к анализу функциональных последствий этих взаимодействий (влияние на активность APE1, Pol β и LigIII α). Ключевым достижением на этом этапе является вывод о том, что ингибирующее действие PARP1 на всех этапах BER и специфическое ингибирующее действие PARP2 на этапе лигирования, выявленные ранее на свободной ДНК, сохраняются и в физиологически релевантном нуклеосомном контексте.

Наиболее яркая и новаторская часть работы посвящена PARP3. Автором обнаружена и количественно охарактеризована способность PARP3 специфически связываться с AP-сайтами в нуклеосоме, причем с четко выраженным предпочтением к области входа-выхода ДНК.

Безусловной сильной стороной диссертации является комплексный подход к картированию белков на нуклеосоме. Данные, полученные высокоразрешающим методом ферментативного футпринтинга (ДНКазы I), были успешно верифицированы и дополнены методом АСМ. Если футпринтинг позволил с точностью до пары нуклеотидов установить участки связывания и выявить стерические препятствия, создаваемые PARP, то АСМ предоставил уникальные данные о глобальных конформационных перестройках нуклеосом и хроматиновых массивов, индуцированных этими взаимодействиями. Важнейшим выводом работы является установление принципиально новой, структурной функции PARP3 как фактора, стабилизирующего и компактизирующего нуклеосомные частицы, что кардинально расширяет современные представления о биологической роли этого белка за пределы его каталитической активности.

Представленные результаты отличаются высокой достоверностью, получены с использованием взаимодополняющих методов и образуют стройную систему доказательств, однозначно свидетельствующих о выдающейся экспериментальной работе и высокой аналитической компетенции автора.

Выводы диссертационной работы являются логическим завершением всего проведенного исследования. Сформулированные автором четыре вывода полностью и исчерпывающе обобщают основные научные результаты, изложенные в работе. Каждый вывод конкретен, подкреплён экспериментальными данными и напрямую соответствует поставленным задачам, что свидетельствует о цельности и завершенности исследования. Достоверность и научная значимость полученных результатов подтверждаются публикационной активностью автора. Основные положения и выводы диссертации нашли своё отражение в 4 (четырёх) статьях, опубликованных в ведущих рецензируемых отечественных и международных научных изданиях, индексируемых в таких международных базах данных, как Web of Science и Scopus. Данный факт не только свидетельствует о соответствии работы высоким международным стандартам, но и демонстрирует признание её значимости научным сообществом. Таким образом, представленные выводы являются верифицированными и опубликованными новыми научными результатами, вносящими существенный вклад в современную биохимию и молекулярную биологию.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ.

Хотя диссертационная работа Украинцева Александра Андреевича выполнена на высочайшем научном уровне, великолепно написана и содержит принципиально значимые научные результаты, в ней встречаются отдельные шероховатости и спорные формулировки.

1. В разделе 4.1, вероятно, было бы нелишним прокомментировать стехиометрию комплексов PARP-субстрат или обозначить константы диссоциации комплексов как «наблюдаемые». При сравнении значений констант, полученных методом торможения в геле и методом анализа анизотропии флуоресценции, упоминается возможность одновременного связывания PARP1 с сайтом повреждения и с концевым участком ДНК. Данные электрофореза этому не противоречат – можно различить несколько полос в геле с характерной для комплексов, но различной подвижностью. Форетическая подвижность комплексов с PARP2 снижается по мере

увеличения концентрации PARP2, вполне что соответствует множественному связыванию.

2. Если принять возможность стехиометрии комплексов отличной от 1:1, соотношение PARP:субстрат стоило указать в тексте или подписях к рисункам в разделе 4.2, т.к. это важно для интерпретации влияния PARP на активность ферментов.

3. Хотя все выводы, представленные в заключительном разделе полностью обоснованы, в разделе 4.3 единожды встречается не подкрепленный экспериментальными данными тезис. На стр. 89 указано следующее: «...аффинность PARP3 к ДНК с разрывом в составе NCP603_U может определяться как размером брешы, так и модификацией 5'-концевого фрагмента...». Вероятно, это опечатка, т.к. эффекты размера брешы диссертант не анализировал, или эти данные не вошли в диссертацию.

4. В разделе 4.4 диссертант проявляет некоторую непоследовательность в употреблении термина “кластер”. Термин используется на протяжении раздела применительно к сайтам повреждения в производных ДНК multi_dU. Как следует из текста на стр. 89 и Рис. 34, сайты распределены стохастически. Учитывая невысокое (<10 %) содержание dUTP в смеси dNTP, использованной при получении multi_dU, попадание нескольких dU/AP-сайтов в один виток ДНК маловероятно, следовательно, их нельзя считать заведомо кластеризованными. Возможно, стоило придерживаться термина “множественные сайты”.

5. В разделе 4.6 можно было бы привести сравнение наблюдаемых высот нуклеосом и PARP. Как справедливо отмечает автор, различить PARP1 и гистоновый октамер методом АСМ едва ли возможно (они близки по массе и, при фиксации на подложке, наблюдаемым размерам/морфологии), однако PARP3 существенно меньше. Высоты в АСМ определяются с большей точностью, чем геометрические размеры в аксиальной плоскости. Возможно, выборочный непосредственный анализ высот (помимо выполненного автором анализа площадей проекций и объемов комплексов) позволил бы различить PARP3, нуклеосомы и их комплексы.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Работа Украинцева А.А. 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 Украинцев Александр Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 — «биоорганическая химия».

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, зав. лабораторией структуры и функций биополимеров.

Варижук Анна Михайловна

15.09.2025

Контактные данные:

тел.: +7(916)5027832, e-mail: annavarizhuk@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.03 — Молекулярная биология.

Адрес места работы:

119435, г. Москва, Малая Пироговская ул., д. 1а,

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Тел.: +7 (499) 246-4409; e-mail: annavarizhuk@rcpcm.org

Подпись сотрудника

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Варижук А.М. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина

ФМБА России, к.б.н.



Кострюкова Е.С.

15.09.2025