

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.

Поли(ADP-рибоза)полимеразы 1, 2 и 3 (PARP1, PARP2 и PARP3) катализируют реакцию присоединения остатка ADP-рибозы к ДНК-связывающим белкам-мишеням и его последующую полимеризацию, играя тем самым одну из ключевых ролей в системе репарации ДНК в клетке. Эта система отвечает за исправление различных повреждений ДНК и в целом лежит в основе поддержания стабильности генома. Многие аспекты механизма данного процесса и роль конкретных участников в нём всё ещё остаются во многом непонятыми. Вместе с тем, особое внимание исследователей в этой области обусловлено также тем, что указанные ферменты признаны высокоперспективными мишенями для противоопухолевой терапии, а некоторые их ингибиторы уже одобрены для клинического применения. Активно ведутся также разработки по повышению селективности этих и поиску новых ингибиторов, чтобы увеличить эффективность терапии различных онкозаболеваний. В общем и целом, необходимость получения полного представления о взаимодействии белков семейства PARP с основными участниками системы репарации ДНК в условиях, приближенных к клеточным, давно назрела. В этой связи, тема автора диссертации по изучению конкретной роли белков PARP1, PARP2 и PARP3 в активности компонентов системы репарации непосредственно на структурной единице хроматина – нуклеосоме несомненно актуальна и имеет значение не только для установления не известных ранее аспектов системы репарации ДНК, но также и очевидный практический потенциал.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

В данной работе автор впервые детально изучил влияние ферментов PARP1, PARP2 и реакции PAR-илирования на каталитическую активность ключевых белков системы эксцизионной репарации оснований (BER) в контексте нуклеосом и сравнил свои данные с таковыми, полученными ранее в реконструированной системе со свободной ДНК. Им обнаружена способность PARP3 взаимодействовать с апуриновыми/апмримидиновыми сайтами (AP-сайтами) в нуклеосоме. Впервые проведён комплексный анализ влияния PARP1, PARP2 и PARP3 на структуру хроматина и стабильность нуклеосом, и показано участие PARP3 в компактизации и стабилизации нуклеосом.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Значимость диссертации состоит в том, что автором получены экспериментальные доказательства релевантности многочисленных свидетельств особенностей взаимодействия ферментов семейства PARP с ключевыми белками системы BER, показанных ранее на модельных ДНК-дуплексах, данным, полученным им на хроматиноподобных структурах. При этом, были выявлены многие специфические особенности взаимодействия ферментов этого семейства с нуклеосомами. Полученные автором результаты способствуют более детальному пониманию процессов, происходящих на хроматине, при повреждении ДНК, и открывают перспективы для разработки новых подходов, направленных на борьбу с онкологическими заболеваниями.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ.

Работа написана по традиционной схеме, содержит разделы “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты”, “Выводы” и “Список литературы”. Работа изложена на 146 страницах. Диссертация иллюстрирована 55-ю рисунками и включает 8 таблиц; список цитируемой литературы насчитывает 286 источников. Приложение к диссертации на 17 страницах содержит 15 рисунков и 7 таблиц.

В разделе “Введение” в краткой форме даются основные понятия в области объектов исследования, изложена актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, указаны научная новизна

работы и её практическая значимость. Здесь же приводятся положения, выносимые на защиту, даётся информация об апробации работы, количестве публикаций, включающем 4 статьи по теме диссертации, а также о личном вкладе автора.

Обзор литературы содержит пять больших разделов, в которых рассматриваются работы по теме диссертации, и даётся представление о современном состоянии знаний в соответствующих областях науки. В первых трёх разделах основной упор делается на изложении информации о структуре и динамике нуклеосом, а также о влиянии образования повреждений ДНК - AP-сайтов на организацию нуклеосом и ферментативную активность основных участников BER. Далее автор приводит информацию о самих белках PARP1, PARP2 и PARP3 как сенсорах повреждений ДНК и регуляторах BER. В заключительной части обзора рассматриваются вопросы применения атомно-силовой микроскопии (АСМ) в изучении нуклеосом и их комплексов. Эта часть обзора хоть и посвящена методу исследования, а не объекту, тем не менее особенно важна в контексте работы, поскольку позволяет оценить возможности данного метода и релевантность полученных с помощью него данных, представленных в диссертации. В целом, обзор хорошо написан, достаточно информативен, хорошо структурирован и иллюстрирован, что помогает глубже понять суть изучаемых вопросов.

Глава “Материалы и методы” содержит полный перечень реагентов и подробное описание методов, использованных автором в своей работе. Автор пунктуально излагает протоколы большого числа разнообразных методик синтеза, выделения, разделения и очистки биополимеров, основанных на амплификации ДНК, гель-электрофорезе и хроматографии в различных приложениях. Здесь же приводятся протокол реконструирования нуклеосом из отдельных компонентов и методы изучения их комплексов с исследуемыми белками. Такое детальное представление экспериментальных процедур позволяет сделать вывод о профессиональном владении автором данными методами исследований, а также даёт возможность их легко воспроизвести или использовать в качестве лабораторного протокола.

Наибольшее место в диссертации отведено главе, содержащей результаты исследования, разделённой на 9 частей с описанием достижений экспериментальной работы автора и заключений, сделанных на основе полученных данных.

На первом этапе работы автор с помощью методов анизотропии флуоресценции и задержки в геле изучал характеристики связывания PARP1 и PARP2 с реконструированными нуклеосомами, в том числе, содержащими повреждение ДНК типа “AP-сайт” или “gap” в различных положениях их структуры. Затем, используя полученные данные, диссертант проверял, какое влияние оказывает связывание указанных ферментов на активность участников BER: эндонуклеазы APE1, полимеразы β и ДНК-лигазы III α , проявляемых ими также в присутствии белка XRCC1. Анализируя полученные результаты, автор пришёл к заключению, что влияние PARP1 и PARP2 на поведение белков-участников BER на нуклеосомных структурах, в целом, сопоставимо с данными, полученными ранее на различных ДНК-субстратах, а именно: PARP1 подавляет активность APE1, Pol β и LigIII α , тогда как PARP2 оказывает влияние только на активность LigIII α . Следующий этап работы посвящён изучению взаимодействия PARP3 как наименее исследованного из белков этого семейства с нуклеосомами. В ходе работы определены характеристики аффинности PARP3 к упомянутым ранее модельным структурам нуклеосом и показано его эффективное, хотя и более слабое, чем у PARP1 и PARP2, взаимодействие с AP-сайтами, причём – преимущественно вблизи области входа-выхода.

Дальнейший этап работы содержал исследования автора по локализации PARP1, PARP2 и PARP3 на нуклеосомных частицах с помощью двух методов: ферментативного футпринтинга с использованием ДНКазы I и с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Диссертанту удалось убедительно показать участки связывания указанных ферментов с нуклеосомами и сформулировать принципиальные различия в способах их взаимодействия с повреждениями ДНК в нуклеосомном контексте. И хотя метод АСМ в данном случае оказался менее информативным, чем метод ферментативного футпринтинга, на заключительном этапе работы именно он позволил автору

определить глобальные структурные изменения в нуклеосомах и хроматиноподобных частицах (состоящих из нескольких нуклеосом), вызванные связыванием с ними белков PARP1, PARP2 и PARP3. Эти исследования убедительно показали различные функции белков семейства PARP во взаимодействии с хроматиноподобными частицами и поддержанию их структурной организации.

На основании полученных в ходе своих исследований результатов автором сформулированы 4 вывода, которые вполне обоснованы и соответствуют достижениям данной диссертационной работы. Основные результаты работы автора опубликованы в 4 статьях в высокорейтинговых отечественных и международных реферируемых научных журналах, индексируемых в основных базах научного цитирования. Всё это указывает на достоверность и высокую научную значимость результатов настоящей диссертационной работы.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ.

Хотя диссертационная работа Украинцева Александра Андреевича выполнена на высочайшем научном уровне, и получены действительно весомые и значимые научные результаты, к сожалению, в ней встречается ряд неточностей, шероховатостей и недочётов. Особенно в этом отношении страдает раздел Методы. Например, автор использует жаргонизмы “нуклеиновый форе́з” (стр. 51) или “супернатант ДНК” (стр. 60). Из схемы, приведённой на рисунке 21, непонятно, как осуществляли диализ, и как проба в диализной ячейке контактировала с буфером? Как рассчитывали молярный коэффициент экстинкции белка (стр. 56)? Как из данных радиоавтографа смогли определить концентрацию меченого нуклеотида (стр. 51)? Не понятен смысл коэффициентов в уравнении (1) (стр. 64): при $x=x_0$ значение y должно равняться y_0 , но этого как-то не получается из этого уравнения. Также, неясно, как “концентрация белка, при которой половина субстрата находится в комплексе с белком” может “определяться значением координаты x_0 ”, когда всё как-раз наоборот? Наконец, для экспериментов по определению констант диссоциации PARP с ДНК-субстратами (стр. 73) двумя методами получены

часто сильно отличающиеся результаты. Автор приводит причины таких расхождений, но не даёт оценки, какие из значений всё-таки ближе к истине?

Вместе с тем, 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:

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@lbio.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@lbio.ru

Подпись сотрудника ИХБФМ СО РАН Малыгина А.А.

заверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.б.н.



Логашенко Е.Б.