

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 PARP1, PARP2 и PARP3 являются ключевыми ферментами системы репарации ДНК, катализирующими посттрансляционную модификацию белков-мишеней путём поли(ADP-рибозил)ирования. Данный процесс играет фундаментальную роль в поддержании стабильности генома, обеспечивая исправление разнообразных повреждений ДНК. Несмотря на признанную важность, детальные молекулярные механизмы функционирования белков PARP, их взаимодополняющие роли и специфичность в отношении различных типов повреждений и партнёров остаются во многом нераскрытыми. Особую актуальность исследованиям в этой области придает тот факт, что PARP1, и в особенности PARP2 и PARP3, являются высокоперспективными мишенями для противоопухолевой терапии. Ряд ингибиторов PARP уже одобрен для клинического применения, а разработка новых, более селективных соединений активно продолжается. В связи с этим, комплексное изучение функционального взаимодействия белков PARP с участниками процесса эксцизионной репарации оснований (BER) в физиологически релевантных условиях — на уровне нуклеосомы, основной структурной единицы хроматина, — является необходимой и назревшей научной задачей. Представленная диссертационная работа, направленная на установление роли PARP1, PARP2 и PARP3 в регуляции активности ферментов BER непосредственно на нуклеосомном субстрате, несомненно, обладает высокой актуальностью. Её результаты вносят значительный вклад в фундаментальное

понимание механизмов репарации ДНК и имеют очевидный практический потенциал для разработки новых стратегий лечения онкологических заболеваний.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

Диссертационное исследование обладает высокой степенью научной новизны, которая заключается в получении ряда принципиально новых результатов, расширяющих современные представления о функциях белков семейства PARP в репарации ДНК и стабилизации хроматина.

Центральным элементом новизны является первое комплексное изучение влияния PARP1, PARP2 и их каталитической активности на работу ферментов BER (таких как APE1, Pol β и LigIII α) не на свободной ДНК, а на нуклеосомном субстрате. Проведённое автором сравнение с данными, полученными на "голой" ДНК, выявило ключевые различия и позволило сделать вывод о критической важности хроматинового контекста для понимания регуляторных функций белков PARP.

Важнейшим открытием работы, составляющим её фундаментальную новизну, является обнаружение ранее не описанных функций белка PARP3. Он специфически связывается с AP-сайтами, локализованными в нуклеосоме. Это указывает на его прямую роль в распознавании односторонних повреждений ДНК в хроматине, что значительно шире его общепринятой функции как сенсора двусторонних разрывов. Наконец, установлен новый класс функций для PARP3 – структурный. Автором впервые показано, что PARP3 эффективно компактизует хроматин и стабилизирует нуклеосомы, в то время как PARP1 и PARP2 подобной активностью в проведённых экспериментах не обладали. Это не только пересматривает существующие взгляды на биологическую роль PARP3, но и вводит его в круг ключевых белков, регулирующих архитектуру хроматина в условиях геномного стресса.

Совокупность полученных данных формирует новую концептуальную основу для понимания роли белков PARP, в частности PARP3, в поддержании стабильности генома.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Теоретическая значимость диссертационного исследования.

Работа обеспечивает переход от упрощённых модельных систем с голой ДНК к физиологически релевантному изучению процесса репарации в контексте хроматина. Экспериментально подтверждена релевантность данных, полученных ранее на свободной ДНК, для процессов, протекающих на нуклеосоме, и, что еще важнее, выявлены ключевые различия. Расширены и пересмотрены существующие представления о функциональной специализации белков семейства PARP. В частности, установлена ранее неизвестная роль PARP3 в распознавании AP-сайтов и стабилизации нуклеосомной структуры, что выводит его из тени PARP1 и определяет как самостоятельного и ключевого участника процессов репарации и ремоделинга хроматина. Полученные результаты формируют новую концептуальную основу для понимания механизмов эпигенетической регуляции репарационных процессов. Данные о том, что белки PARP не только инициируют репарацию, но и активно влияют на структуру хроматина в месте повреждения, позволяют по-новому взглянуть на поддержание стабильности генома.

Практическая значимость работы.

Результаты исследования имеют непосредственное значение для разработки новых противоопухолевых препаратов и оптимизации существующих стратегий терапии ингибиторами PARP. Понимание специфических функций PARP2 и PARP3 на нуклеосоме открывает перспективы для создания селективных ингибиторов, нацеленных на конкретные изоформы, что может повысить эффективность лечения и снизить

побочные эффекты. Полученные данные могут быть использованы для разработки новых диагностических платформ, направленных на оценку состояния системы репарации ДНК в опухолевых клетках пациента и прогнозирования их чувствительности к химио- и лучевой терапии. Разработанные автором экспериментальные подходы и методики (использование реконструированных нуклеосом с сайт-специфичными повреждениями, анализ активности ферментов) представляют собой ценный методологический инструментарий для дальнейших исследований в области биохимии хроматина и репарации ДНК.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ.

Структура диссертации является традиционной для научных работ и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, представление и обсуждение результатов, выводы и список литературы. Работа отличается целостностью и логичностью изложения. Объём основного текста составляет 146 страниц. Наглядность и доказательность результатов обеспечены 55 рисунками и 8 таблицами. Теоретическая база исследования является исчерпывающей и современной, что подтверждается списком литературы из 286 источников, преимущественно актуальных публикаций в международных научных журналах. Важным достоинством работы является наличие обширного Приложения (17 страниц, 15 рисунков, 7 таблиц), в котором представлены дополнительные экспериментальные данные, подтверждающие надёжность и достоверность результатов, изложенных в основной части диссертации. Это свидетельствует о большом объёме проведённой работы и глубине проработки темы.

Раздел «Введение» написан в строгом соответствии с предъявляемыми к диссертационным работам требованиями. В нём компактно изложена теоретическая основа исследования, дающая чёткое представление о проблемном поле работы. Чётко аргументирована актуальность темы,

сформулированы цель и конкретные задачи, направленные на её достижение. В данном разделе представлена научная новизна, теоретическая и практическая значимости результатов работы. На защиту вынесены конкретные и обоснованные положения, логически вытекающие из содержания диссертации и отражающие её главные научные результаты. Приведённые данные об апробации работы свидетельствуют о её публичном обсуждении на научных конференциях. Выполнен критерий публикационной активности: по теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях. Личный вклад автора является определяющим и документально подтверждённым во всех представленных результатах, что подчёркивает его роль как самостоятельного исследователя.

Раздел «Обзор литературы» демонстрирует исключительно глубокую проработку автором темы исследования. Обзор не является формальным перечислением источников, а представляет собой целостный, логически выстроенный анализ современного состояния проблемы. Структурно обзор разделен на пять тематических блоков, что отражает комплексный и системный подход автора. Первые три раздела посвящены детальному анализу структуры и динамики нуклеосом, а также ключевому влиянию повреждений ДНК (в частности, AP-сайтов) на их организацию и на активность ферментов процесса BER. Это создает исчерпывающий контекст и теоретический фундамент для собственных исследований автора. Последующие разделы логически развивают тему: автор переходит к всестороннему рассмотрению белков PARP1, PARP2 и PARP3, акцентируя внимание на их функциях в качестве сенсоров повреждений ДНК и ключевых регуляторов процесса BER. Особого внимания заслуживает заключительная часть обзора, в которой скрупулезно проанализированы возможности применения атомно-силовой микроскопии (АСМ) для изучения структуры нуклеосом и их комплексов с белками. Несмотря на методическую направленность, этот раздел органично вписан в общую канву и имеет критически важное значение для данной работы, так как он не только обосновывает выбор метода, но и позволяет

адекватно оценить достоверность и интерпретацию полученных автором экспериментальных данных, представленных в диссертации. В целом, литературный обзор выполнен на высоком научном уровне: он глубоко информативен, прекрасно структурирован, содержит необходимые иллюстрации и демонстрирует свободное владение автором темой, что позволяет признать его несомненным достоинством диссертационной работы.

Глава «Материалы и методы» является образцовой в своей полноте и точности. Она содержит исчерпывающий перечень всех использованных реагентов, биологических материалов и оборудования, что демонстрирует исключительную тщательность автора в документировании экспериментальной части работы. Методологический раздел поражает широтой охвата и глубиной проработки. Детально, с указанием критических параметров, описаны сложные многоступенчатые протоколы, включающие:

- синтез и высокоочищенную подготовку ДНК-субстратов;
- реконструирование нуклеосом *in vitro* — ключевую и технически сложную методологическую основу всего исследования;
- широкий спектр биохимических и биофизических методов: от аффинной хроматографии и гель-электрофореза для анализа белков и их комплексов с ДНК до высокочувствительных ферментативных тестов.

Особенно ценно, что автор не ограничивается перечислением методов, а предоставляет полноценные, готовые к использованию лабораторные протоколы, включая методы визуализации комплексов с помощью АСМ. Такой подход не только подтверждает высочайший уровень технической компетентности соискателя, но и обеспечивает абсолютную воспроизводимость всех представленных в диссертации результатов, что является золотым стандартом в научной практике. Этот раздел производит впечатление исчерпывающего методического руководства и оставляет полную уверенность в достоверности и обоснованности каждого полученного результата.

Раздел «Результаты и их обсуждение» является центральным и наиболее объемным в диссертации, структурно разделенным на 9 логически завершенных частей, каждая из которых посвящена решению конкретной задачи. Изложение материала демонстрирует строгую последовательность и глубину научного анализа.

На первом этапе с применением высокоточных методов (флуоресцентная анизотропия, электрофоретическое разделение комплексов) автор всесторонне охарактеризовал кинетику и аффинность связывания PARP1 и PARP2 с реконструированными нуклеосомами, содержащими различные типы повреждений (AP-сайт, односторонний разрыв) в разных позициях и ориентации в структуре NCP. Это позволило установить ключевые параметры данных взаимодействий в зависимости от типа и локализации повреждения.

Последовательно и методично диссертантом было исследовано влияние PARP1 и PARP2 на каталитическую активность ключевых ферментов BER (APE1, Pol β , LigIII α) на нуклеосомном субстрате. Важнейшим выводом этого этапа стало установление того, что ранее полученные на свободной ДНК закономерности в целом сохраняются и в хроматиновом контексте: PARP1 ингибирует все основные этапы репарации, тогда как PARP2 проявляет специфичность, подавляя преимущественно активность Pol β и ДНК-лигазы III α .

Значительный вклад в новое знание внесло детальное исследование PARP3. Автор впервые продемонстрировал, что данный белок, хотя и с меньшим сродством, чем PARP1/2, эффективно связывается с AP-сайтами в нуклеосоме, проявляя выраженную позиционную специфичность (зона входа-выхода ДНК).

Наиболее сильной стороной работы является комплексное применение двух независимых физико-биохимических методов — ферментативного футпринтинга (ДНКазы I) и АСМ — для точного картирования участков связывания всех трех PARP на нуклеосоме. Это позволило не только

идентифицировать сайты связывания, но и выявить фундаментальные различия в механизмах их взаимодействия с нуклеосомой.

Несмотря на ограниченное разрешение АСМ для точного картирования на уровне нуклеотидов, именно этот метод оказался незаменим для визуализации глобальных изменений в структуре хроматина, индуцированных связыванием с белками PARP. Автор убедительно показал, что PARP3 обладает уникальной, ранее не описанной функцией — он выступает в роли фактора, способного компактизовать и стабилизировать структуру как моонуклеосом, так и нуклеосомных массивов.

В целом, представленные результаты являются исключительно полными, достоверными и логически взаимосвязанными. Они свидетельствуют о высочайшей экспериментальной культуре автора и его выдающейся способности к комплексному анализу сложных биохимических данных.

Сформулированные автором выводы являются полностью обоснованными, логично вытекают из представленных результатов и адекватно отражают научные достижения диссертационной работы. Публикации по теме диссертации (4 статьи в высокорейтинговых рецензируемых журналах, индексируемых в международных базах данных) служат объективным и неоспоримым подтверждением достоверности и новизны полученных результатов, а также соответствия работы современным требованиям к научным трудам. Всё вышеизложенное позволяет сделать заключение о безусловной научной состоятельности и значимости диссертационного исследования.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ.

К диссертационной работе Украинцева Александра Андреевича имеется ряд замечаний, пожеланий и вопросов:

- 1) Начиная с литературного обзора автор допускает неточности в использовании термина нуклеосома и термина NCP. По общепринятому

определению нуклеосома и NCP это не одно и то же. Нуклеосома – повторяющийся элемент хроматина, то есть это NCP плюс часть линкерной ДНК. NCP в русскоязычной литературе можно называть коровой частицей нуклеосомы.

- 2) Следовало бы привести методику получения октамеров гистонов – от их качества зависят все результаты, в тексте найдена только информация о том, что они были получены от коллег.
- 3) При подготовке нуклеосом с AP-сайтами и с одноцепочечными разрывами соответствующие ферментативные реакции проводились непосредственно на нуклеосомах. Не проще было бы провести их на ДНК, а затем собрать нуклеосомы с модифицированной ДНК? Литературные данные поддерживают идею о том, что хорошо позиционирующиеся последовательности собираются на октамере в нужном положении, даже если в ДНК есть разрыв (см. например, 10.1038/s41467-025-57915-2)
- 4) Почему использовался 603, а не 601 сиквенс ДНК. Последний дает более стабильные нуклеосомы.
- 5) В статье 10.1074/jbc.M112.397067 показано, что PARP1 плохо связывается с NCP без линкерных участков ДНК. Просьба прояснить почему в данной работе (при измерении констант диссоциации с NCP603_U) PARP1 связывался достаточно хорошо.
- 6) В работе использованы два способа нанесения ДНК-белковых комплексов на слюду: с помощью ионов никеля и с помощью APS. Почему в разных частях работы использованы разные способы, и почему именно эти?
- 7) Имеются некоторые опечатки, напр. Стр. 49 – должно быть *Gallus gallus* вместо *Galus Galus*.

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



Шайтан Алексей Константинович

доктор физико-математических наук

(специальность — 03.01.09 — Математическая биология, биоинформатика),

профессор РАН, член-корреспондент РАН,

профессор кафедры биоинженерии биологического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного

учреждения высшего образования «Московский государственный

университет имени М. В. Ломоносова»

14.09.2025 г.

Контактные данные

Телефон: +7(495) 939-57-38; E-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru;

Почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Подпись сотрудника биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова А.К. Шайтана заверяю:

Ученый секретарь биологического факультета

МГУ имени М.В.Ломоносова



Е.В. Петрова

Заместитель декана биологического факультета

МГУ имени М.В.Ломоносова, профессор, д.б.н.



А.М. Рубцов