

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Кошкиной Дарьи Олеговны
на тему: «Пионерная функция PARP1 в организации хроматина:
структурные перестройки нуклеосом и эффекты ингибиторов PARP»
по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия**

Диссертационная работа Дарьи Олеговны посвящена одному из аспектов реорганизации хроматина, а именно его декомпактизации, опосредованной поли(АДФ-рибоза)-полимеразой PARP1. Данный фермент известен способностью распознавать и маркировать сайты повреждения ДНК путем PAR-илирования гистонов, т.е. присоединения к ним остатков поли(АДФ-рибозы) для дальнейшего привлечения ферментов системы репарации. Модификация хроматина способствует его локальной декомпактизации для обеспечения доступа факторов репарации к сайту повреждения, однако детали этого процесса, включая роль гомологов PARP1 и фактора PAR-илирования гистонов, активно освещаются в литературе лишь последние годы и изучены не полностью. Открытыми вопросами остаются механизм прямого ремоделирования нуклеосомы ферментом PARP (без участия фактора PAR-илирования гистонов) и возможность регуляции этого процесса с помощью терапевтических агентов класса PARP-ингибиторов (PARPi) либо за счет кооперативного действия PARP и транскрипционных факторов, таких как p53. Контроль нуклеосомной укладки – чрезвычайно актуальная задача современной молекулярной биологии. В диссертации это обсуждается на примере локальной декомпактизации для реализации (эпи)генетического редактирования с использованием молекулярных инструментов на основе dCas9. Повышение эффективности редактирования труднодоступных участков (обычно в гетерохроматине) позволит ускорить развитие ряда генотерапевтических подходов и упростит фундаментальные исследования, что определяет высокую практическую значимость диссертационного исследования.

Именно способность инициировать локальную декомпактизацию хроматина и повышать доступность ДНК для связывания сиквенс-специфичными факторами за счет ремоделирования нуклеосомы и вытеснения линкерного гистона Дарья Олеговна определяет как «пионерную» функцию PARP. В этом прослеживается по-своему элегантная, хотя и несколько спорная, аналогия с пионерными транскрипционными факторами. Подобный взгляд на функцию PARP сам по себе является новаторским. Эксперименты, выполненные в рамках проверки данной функции PARP, также являются оригинальными. Иными словами, **новизна** исследования несомненна, а его итоги существенно дополняют представления о биологической PARP, что определяет **научную значимость** работы. Методология исследования рациональна; выбор моделей и методов обоснован, но не является тривиальным. Дарья Олеговна применила классические подходы генной инженерии и молекулярной биологии для реконструирования нуклеосом и хроматосом, однако модифицировала ДНК-матрицу таким образом, чтобы обеспечить мониторинг нуклеосомных перестроек методом spFRET. Это можно считать классическим примером современной молекулярной инженерии в рамках биоинженерии, что полностью **соответствует заявленной специальности**.

Подобные исследования *in vitro*, предусматривающие детекцию состояний единичных молекул и комплексов, необходимы для детальной характеристики механизмов реорганизации хроматина. Их нельзя заменить ни омиксными исследованиями на клеточных моделях, ни упрощенным скринингом в моделях без хроматинового контекста. Дарья Олеговна выдвигает сходный тезис при обсуждении PARPi, для тестирования которых именно нуклеосомные модели представляются оптимальными в плане баланса информативности и простоты. Возможности скрининга в нуклеосомных моделях проиллюстрированы на примере нового PARPi класса природных полифенолов; его предваряет анализ трех известных PARPi, применяемых в клинике. Полученные для известных соединений результаты подтверждают

описанное ранее удержание PARP на ДНК, что можно считать валидацией предложенного подхода.

Таким образом, грамотное планирование исследования и использование необходимых контролей гарантируют **достоверность** результатов и выводов. Выявленные эффекты складываются в непротиворечивую картину PARP-опосредованных нуклеосомных перестроек. Важным контролем представляется частичное или полное восстановление распределения состояний нуклеосомы после диссоциации PARP вследствие ее аутомодификации в присутствии субстрата (НАД⁺). Традиционный и максимально наглядный метод электрофореза в ПААГ удачно дополняет более современный и информативный, но несколько менее однозначный в плане интерпретации метод spFRET. Исследование выполнено с несколькими нуклеосомными моделями, которые различаются матрицами, гистоновыми вариантами, наличием/отсутствием линкерного гистона и др., т.е. отражают различные состояния хроматина, что позволяет констатировать **комплексность** исследования.

Структура диссертационной работы традиционна. Вводный раздел содержит обоснование актуальности темы, формулировки цели и задач, раскрывает фундаментальную ценность работы, ее новизну и т.д. В обзоре литературы достаточно полно отражено современное состояние исследований по теме диссертации. Глава «Материалы и методы» содержит все ключевые протоколы экспериментов. Отдельные незначительные упущения указаны ниже. Глава «Результаты и их обсуждение» включает пять разделов, которые соотносятся с задачами, а промежуточные выводы по разделам согласуются с положениями, выносимыми на защиту. Педалирование «пионерной функции» в промежуточных выводах видится мне несколько чрезмерным, но это субъективно. В целом работа выстроена очень логично. Материал изложен достаточно академично. Его содержание полностью отражено в автореферате; по материалам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых изданиях. В целом работа видится зрелым фундаментальным исследованием. Впечатление

несколько портит изрядное количество опечаток. Прочие замечания и вопросы перечислены ниже.

1. Несколько неточностей в подписях к рисункам. Подписи совпадают для Рис. 28 и 29, но на первом показана не моонуклеосома, а ДНК-матрица. Про визуализацию информация явно не полная. Указана только детекция по флуоресценции Су3. Маркер длин не был бы виден. Особенно это бросается в глаза на Рис 30, где маркер выглядит максимально контрастно. Подвижность свободной моонуклеосомы варьируется. На Рис. 29 она соответствует 500 п.н., на Рис. 30 явно меньше.

2. Чтобы исключить изменение наблюдаемой эффективности FRET по причинам, не связанным с ремоделированием нуклеосомы (например, из-за экранирования донора или акцептора от растворителя остатками PARP), можно было использовать в качестве отрицательного контроля «ридер» модификаций гистонов или иной белок, заведомо не влияющий на нуклеосомную частицу напрямую.

3. Не указано, как получали длинные праймеры с меткой в середине (нетривиальный синтез).

4. Высокая эффективность FRET в нуклеосоме с H2A.Z контринтуитивна, т.к. данный гистоновый вариант ассоциирован с более лабильными октамерами и более рыхлой общей укладкой. Превышающие единицу и, тем более, отрицательные значения эффективности FRET на гистограммах распределения состояний едва ли имеют физический смысл. Вероятно, стоило представить чуть иначе.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном

университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Кошкина Дарья Олеговна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

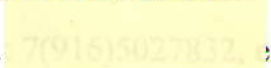
Официальный оппонент:

доктор химических наук,
заведующая лабораторией структуры и функций биополимеров
ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической
медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-
биологического агентства»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России)

ВАРИЖУК Анна Михайловна

 19.05.2026

Контактные данные:

тел.  -mail: 

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а,
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
лаборатория структуры и функций биополимеров

Тел.: 7 (499) 246-44-09; e-mail: info@rcpcm.org

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

Варижук А.М. удостоверяю:

Специалист по кадрам


И. Дьячкова
19.05.2026