

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»

Диссертация Кошкиной Д.О. посвящена изучению пионерной (хроматин-реорганизующей) функции PARP1. Эта тематика в настоящее время привлекает значительное внимание исследователей в связи с перспективностью использования PARP1 в качестве мишени для противораковой терапии. При этом традиционное направление исследований нацелено на ингибирование ферментативной функции PARP1, тогда как альтернативные механизмы, связанные с потенциальным участием PARP1 в ремоделировании хроматина и регуляции экспрессии генов независимо от участия в репарации ДНК остаются мало изученными. Именно в этом направлении и были сосредоточены усилия диссертанта, и именно это направление связано с высокой актуальностью данного исследования.

Диссертация Кошкиной Д.О. состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и выводов. Объединение результатов и обсуждения в один раздел мне представляется оправданным, поскольку таким образом читателю проще держать в уме все разнообразные условия экспериментов.

Литературный обзор представляет собой достаточно полный анализ как структуры хроматина (с акцентом на нуклеосомное строение и его роль в регуляции активности генома), так и структуры и функции PARP1. Отдельные разделы посвящены структуре и функции p53 как мишени и партнера PARP1, связывающего повреждение ДНК с регуляцией ответа клеток на стресс, а также системе CRISPR/Cas. Последнее выглядит обоснованным ввиду того, что эффективность инструментов геномного редактирования прямо зависит от хроматиновой структуры матрицы, а основная идея автора заключается в возможности управления состоянием хроматина через модуляцию ремоделирующей функции PARP1. Таким образом, обзор

литературы создает надежный фундамент для проведения собственных экспериментов. Из литобзора логично вытекают цели и задачи исследования, поэтому мне кажется более логичным поместить их описание именно после данного раздела, а не перед ним.

Глава «Материалы и методы» в первую очередь демонстрирует богатый методический арсенал диссертанта, включающий разнообразные методические подходы (выделение и очистка рекомбинантных белков, реконструкция нуклеосом с заданной структурой *in vitro*, анализ ДНК-белковых взаимодействия методом ретардации в геле, spFRET). Большинство методов описано весьма подробно, однако описания деталей оптической системы для spFRET мне показалось недостаточным. Какие лазерные линии использовали для возбуждения? Как рассчитывали коэффициенты перекрытия спектров для spFRET? Учитывались ли спектральные диапазоны оптических элементов? Хотелось бы также увидеть более строгий статистический анализ результатов измерений.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из нескольких частей. Результаты излагаются в логичной последовательности: от фундаментального вопроса - как PARP1 влияет на структуру нуклеосомы - к прикладным аспектам - взаимодействие с p53 и Cas, роль ингибиторов. Автор использует разнообразные модельные системы: канонические нуклеосомы и нуклеосомы с вариантами гистонов (H2A.Z), хроматосомы, нуклеосомы с разной длиной линкеров и позицией FRET-пар. Следует отметить, что процедуры получения реконструированных нуклеосом с различными свойствами, описанные в материалах и методах, уже упоминаются в разделе результатов как само собой разумеющееся, однако их следовало бы отдельно включить в результаты ввиду их трудоемкости и важности для всего исследования в целом. Характер взаимодействия PARP1 с нуклеосомами оценивался по изменению подвижности нуклеосом в геле, а влияние присоединения PARP1 на структуру нуклеосомы анализировали по изменению сигнала FRET. Данный подход представляется весьма информативным, однако по конкретным результатам и их интерпретации у меня возникли некоторые вопросы.

Я не согласен, что характер перестроек нуклеосом при связывании с PARP1 не зависит от состава ДНК, все-таки соотношение высот пиков на рис. 32 и 33

отличается. А еще визуально кажется, что площади под черной и синей кривыми на рис.32 не равны. Как это может быть?

Как происходило бы ремоделирование нуклеосом с длинным линкером при связывании PARP1? Этот важный контроль отсутствует.

Во всех экспериментах в реконструированных мононуклеосомах неизбежно присутствуют концы ДНК и PARP1 сначала взаимодействует с ними. В нативных условиях концов нет. Вопросы: как повлияет это на связывание PARP нуклеосомой? Сможет ли PARP ремоделировать нуклеосому в этих условиях?

Заключение об ADP-рибозилировании H1.0 для его вытеснения при связывании PARP1 с нуклеосомами с длинным линкером выглядит чересчур категоричным и не подтверждено напрямую экспериментально.

В описании экспериментов с H2A.Z-нуклеосомами в тексте указана концентрация PARP1 40 нМ, а в обозначениях к рисункам (рис.37) - 30 нМ. Что правильно?

Утверждение о более эффективном связывании PARP1 с H2A.Z-нуклеосомами (стр. 94) не подтверждается результатами.

Рис.39 - что за бэнды без добавления р53DBD появляются на R16?

Рис.45.Б - легенда не соответствует изображению!!!!

Рис.46 - дорожки 3 и 6 не отличаются! Но в первом случае добавлен только р53, а во втором - только НАД+. Как такое может быть?

Рис. 50 - почему при 40 нМ PARP с нуклеосомой связывается только одна молекула PARP (а не две или три, как на рис.33)? Если, как утверждает автор, PARP1 позволяет образовать высокомолекулярный комплекс, надо показать старт геля на рисунке.

При ингибировании PARP1, вызывающем эффект «траппинга», меняется стехиометрия комплекса нуклеосома-PARP1. Как Вы объясните данный эффект?

Рис. 54Г - какая концентрация PARP1 использовалась? В легенде и в тексте не указано. Как Вы интерпретируете наблюдаемые бэнды?

Помимо этого, есть ряд минорных замечаний, касающихся стиля изложения и оформления. Из них самым существенным представляется оформление списка цитируемой литературы: в тексте ссылки даны в формате (Автор, год), а список сформатирован по ГОСТ, т.е. Заголовок, Автор, Выходные данные. Такое оформление очень неудобно, следовало бы либо в тексте указывать номера ссылок, либо в списке форматировать ссылки начиная с авторов.

В тексте обнаруживается довольно большое количество опечаток, нарушений согласования частей предложения, неуклюжих переводов англоязычных терминов, нарушений форматирования. На рис.5 NLS (nuclear localization signal) ошибочно обозначен как «NSL». Рис.20 и 21 дублируют друг друга. Эти недочеты немного снижают в целом положительное впечатление от работы, указывая на некоторую торопливость на финальной стадии подготовки к защите, но смысл при этом не искажают.

Таким образом, 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 биологических наук,
Заведующий отделом,

НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова

Киреев Игорь Игоревич

13.06.2026

Контактные данные:

тел.: 79293658053 e-mail: ikireev@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.03.04 - Клеточная биология и цитология

Адрес места работы: 119234, г. Москва, р-н. Ленинские Горы, д. 1, стр.40
МГУ имени М.В.Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского
Тел.: +74959395528; e-mail: kireev@belozersky.msu.ru

Подпись сотрудника НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского И.И.Киреева удостоверяю:
руководитель/кадровый работник

13.06.2026