

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы

Кошкиной Дарьи Олеговны

на тему: «Пионерная функция PARP1 в организации хроматина: структурные перестройки нуклеосом и эффекты ингибиторов PARP»
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.1.10 «Биомеханика и биоинженерия»

Актуальность общая характеристика

Диссертационная работа Кошкиной Д.О. посвящена анализу пионерной функции PARP1 на нуклеосомном уровне, его взаимодействию с ключевыми регуляторными белками (p53, dCas9) и изучению механизмов действия синтетических и природных ингибиторов PARP1 в нуклеосомных системах. Тематика исследования соответствует современному направлению работ на стыке молекулярной биологии хроматина, биофизики и биоинженерии и является актуальной в контексте как фундаментального понимания динамики хроматина, так и развития таргетных подходов к регуляции экспрессии генов.

В разделе актуальности автор корректно связывает роль нуклеосомы как базовой единицы упаковки генома с проблемой доступности ДНК для белков-эффекторов и показывает, что PARP1, традиционно рассматриваемый как сенсор разрывов ДНК, может являться фактором, влияющим на структуру хроматина и транскрипционные программы. В то же время раздел несколько перегружен упоминаниями множества потенциальных прикладных направлений, что формально выходит за рамки *in vitro*-моделей и требует более детального анализа применимости на клеточных или организменных моделях.

Научная новизна

В автореферате заявлена значительная совокупность новых результатов. Впервые показано, что PARP1 обладает выраженной нуклеосом-реорганизующей способностью, перестраивая нуклеосомы по всей длине ДНК, включая коровую и линкерную области, причем этот эффект не зависит от нуклеотидной последовательности, набора посттрансляционных модификаций гистонов и наличия линкерной ДНК. Установлено, что PARP1 способен вытеснять линкерный гистон H1.0 из реконструированного хроматосом при коротких линкерных участках и демонстрирует повышенную аффинность и реорганизующую активность в отношении H2A.Z-содержащих нуклеосом.

Новизну представляют данные о кооперации PARP1 с p53 на нуклеосомах различного состава, формировании устойчивого мультимолекулярного комплекса нуклеосома-PARP1-p53DBD в присутствии вариантного гистона H2A.Z, а также результаты, демонстрирующие, что PARP1 повышает доступность нуклеосомной ДНК для CRISPR/dCas-конструктов, ранее не связывающихся с участками в области диады нуклеосомы. Существенным элементом новизны является разработка *in*

vitro-платформы на основе позиционированных нуклеосом для сравнительного анализа механизмов действия клинических PARP-ингибиторов (олапариб, талазопариб, велипариб) и природного модулятора ресвератрола с оценкой траппинга PARP1 на нуклеосомах.

Методологический уровень

Методическая часть работы базируется на современном наборе подходов: используются модельные нуклеосомы на позиционирующих последовательностях Widom, донорный хроматин, рекомбинантные гистоны человека, в том числе вариантный гистон H2A.Z, а также линкерный гистон H1.0 для воспроизведения различных структурных состояний хроматина. Для анализа структурно-функциональных изменений применены spFRET микроскопия, гель-шифт анализ, вестерн-блот, а также набор других биохимических и биофизических методик, что позволяет получать как качественную, так и количественную информацию о реорганизации нуклеосомных комплексов.

К незначительным недостаткам можно отнести отсутствие в автореферате информации о количестве технических и биологических повторов экспериментов, хотя такая информация, наверняка, указано в тексте диссертации, а в автореферат она не была интегрирована из-за ограничений на объем автореферата.

Основные результаты и их интерпретация

На основании комплекса spFRET-измерений и гель-шифт анализа автор показывает, что PARP1 образует с нуклеосомами несколько типов комплексов, сопровождающихся выраженной реорганизацией как коровой ДНК нуклеосомы, так и линкерных участков, и что эффект в целом не зависит от источника гистонов, наличия ПТМ и линкерных сегментов. Показана конкуренция PARP1 и H1.0 за связывание с нуклеосомами, причем при использовании укороченных линкеров PARP1 вытесняет H1.0, а при использовании более длинных – преимущество сохраняется за линкерным гистоном.

Особый интерес представляют результаты по H2A.Z-содержащим нуклеосомам, для которых выявлена более выраженная реорганизация под действием PARP1 и повышенная эффективность связывания p53DBD, а также формирование устойчивого комплекса нуклеосома-PARP1-p53. Данные по совместному действию PARP1 и p53, а также по влиянию PARP1 на доступность нуклеосомной ДНК для dCas9 дают важные соображения о возможной кооперации пионерных факторов и ремоделирующих белков при формировании участков открытого хроматина.

Отдельный блок результатов касается анализа механизмов действия клинических PARP-ингибиторов и ресвератрола в нуклеосомной системе: продемонстрированы различия в эффективности траппинга PARP1 исследуемыми соединениями, а также показано, что ресвератрол снижает аффинность PARP1 к нуклеосомной ДНК, подавляя авто-поли(АДФ-рибозил)ирование в субмикромольном диапазоне концентраций. Эти

данные хорошо вписываются в известные клеточные эффекты PARP-ингибиторов и расширяют их понимание за счет детального рассмотрения на нуклеосомном уровне.

В целом интерпретация результатов выглядит аккуратной и аргументированной. Некоторая часть формулировок в заключительных разделах носит несколько расширительный характер (особенно при обсуждении перспектив клинического и биоинженерного применения), но при этом экспериментальная база для ключевых механистических выводов в автореферате изложена достаточно последовательно.

Публикации и апробация

По материалам диссертации опубликовано 7 работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ, включая международные журналы (Cells, Biomolecules, Acta Naturae) и статьи в Вестнике МГУ. Это свидетельствует о признании результатов работы профессиональным сообществом на как международном, так и национальном уровне.

Результаты диссертации многократно апробированы на российских и международных конференциях и научных школах, включая специализированные форумы по биохимической физике, молекулярной онкологии, структурной биологии и биоинженерии.

Замечания и вопросы

1. В тексте автореферата при первом упоминании рисунка 2 сразу дается ссылка на подрисунок 2 Д, а уже затем на 2А и т.д. Возможно, было бы правильнее в панели рисунков 2Д поместить на первое место, раз с него начинается рассмотрение результатов.
2. В тексте не объясняется, чем отличаются позиционирующие последовательности Widom 601 и Widom 603. Какие еще бывают позиционирующие последовательности, и чем продиктована необходимость проверки гипотез именно на этих субстратах?
3. На рисунке 6 В дважды повторяется один и тот же образец (5 и 7 дорожка с образцами, в реакционной смеси присутствуют все компоненты), однако паттерн наблюдаемых полос отличается, чем можно объяснить это?
4. В качестве модели для изучения влияния PARP1 на доступность ДНК в составе нуклеосом автор предложил использовать dCas9 в комплексе с гидовой РНК. На мой взгляд более наглядным было бы использовать каталитически-активную форму Cas9 и оценивать доступность целевой последовательности в ДНК по разрезанию субстрата. Почему автор предпочел использовать именно dCas9? Проверяли ли Вы или коллеги способность Cas9 вносить разрыв в нуклеосом-связанную ДНК в присутствии PARP1?

Заключение

Отмеченные замечания не снижают общей высокой оценки диссертационной работы. Представленное исследование является законченным, методически тщательно

выполненным и обладает значимой научной новизной. Работа Кошкиной Дарьи Олеговны вносит существенный вклад в понимание структурных механизмов пионерной функции PARP1, его взаимодействия с p53 и CRISPR/dCas-системами, а также в механистический анализ действия PARP-ингибиторов и природных модуляторов на нуклеосомном уровне.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.1.10 «Биомеханика и биоинженерия» (по биологическим наукам), а также требованиям, предъявляемым Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к кандидатским диссертациям и авторефератам по данному направлению. Считаю, что Кошкина Дарья Олеговна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10 «Биомеханика и биоинженерия».

К.б.н., доцент химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова

Анисенко А.Н.

22.06.2026

Личную подпись
ЗАВЕРЯЮ:
Зам. Нач. отдела
химического факультета

Ка