



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки**

**Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)**

Бавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

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 и научная значимость

Диссертационная работа Кошкиной Д.О. посвящена изучению пионерной функции PARP1 на нуклеосомном уровне, влиянию этого белка на структуры нуклеосом и хроматосом, а также эффектам синтетических и природных ингибиторов PARP1 в контексте реорганизации хроматина. Актуальность темы не вызывает сомнений: PARP1 уже давно рассматривается как ключевой сенсор разрывов ДНК и мишень клинически применяемых ингибиторов, но его роль в организации хроматина и доступности ДНК для регуляторных комплексов остается существенно менее изученной. Особое значение имеет акцент на пионерной активности PARP1 и ее влиянии на доступность нуклеосомной ДНК для транскрипционных факторов (p53) и CRISPR/dCas-систем, что напрямую связано с развитием новых биоинженерных подходов к управлению экспрессией генов и преодолению ограничений эпигеномного редактирования. Связь с проблематикой эффективности и токсичности PARP-ингибиторов, а также поиск нетипичных модуляторов (ресвератрол) подчеркивают прикладную значимость работы для онкологии и фармакологии.

Научная новизна

В автореферате заявлен ряд результатов, позиционируемых как новые: показано, что PARP1 универсально реорганизует нуклеосомы по всей длине ДНК вне зависимости от источника гистоновой коры, набора посттрансляционных модификаций, наличия линкерной ДНК и нуклеотидной последовательности; выявлена способность PARP1 вытеснять линкерный гистон H1.0 при коротких линкерных участках нуклеосомы; продемонстрирована повышенная эффективность реорганизации H2A.Z-содержащих нуклеосом и формирование мультимолекулярного комплекса нуклеосома-PARP1-

p53DBD; разработана *in vitro*-платформа для сравнительного анализа известных PARP-ингибиторов, а также оценки ингибирующей активности иных химических соединений, таких как ресвератрол. Важным элементом новизны является демонстрация того, что PARP1 выступает как АТФ-независимый фактор ремоделинга, повышающий доступность нуклеосомной ДНК для dCas9 и p53, а также детализация механизмов траппинга PARP1 разными ингибиторами на нуклеосомном уровне.

Вместе с тем, в автореферате новизна заявлена преимущественно в обобщенном виде: не всегда ясно, какие результаты действительно получены впервые, а какие представляют собой развитие ранее опубликованных данных автора и коллег; было бы полезно более четко разграничивать вклад данной диссертации относительно уже имеющихся публикаций, особенно учитывая большой перечень совместных работ.

Методическая часть

Работа основана на применении современных и адекватных задачам исследования методов молекулярной биологии, биохимии и биофизики, включая реконструкцию нуклеосом на позиционирующих последовательностях, использование донорного хроматина, spFRET для регистрации конформационных изменений, гель-шифт анализ, вестерн-блот и конфокальную микроскопию. Конструкции с вариацией расположения флуоресцентных меток в коровой и линкерной областях, а также модели с H2A.Z и H1.0 позволяют модифицировать структурный контекст хроматина.

При этом описание методологии в автореферате местами оказывается чрезмерно обобщенным: сведения о числе повторов, критериях статистической обработки, диапазонах концентраций для ключевых экспериментов (например, для dCas9-системы, p53DBD, отдельных ингибиторов) даются фрагментарно. Для читателя, не знакомого с полным текстом диссертации, было бы полезно более четко указать, как именно оценивалась воспроизводимость spFRET-распределений, какие статистические тесты применялись и каким образом контролировались возможные артефакты, связанные с агрегацией соединений (в частности, ресвератрола).

Основные результаты и их интерпретация

В автореферате последовательно описаны:

- 1) реорганизация нуклеосом под действием PARP1, образование комплексов различной стехиометрии и независимость эффекта от последовательности ДНК, ПТМ и наличия линкеров;
- 2) конкуренция PARP1 с H1.0 и зависимость вытеснения линкерного гистона от длины линкера;
- 3) повышенная чувствительность H2A.Z-содержащих нуклеосом к реорганизации PARP1 и связыванию p53;
- 4) кооперативное влияние PARP1 и p53 на структуру нуклеосом и формирование стабильного комплекса с H2A.Z;
- 5) усиление связывания dCas9 с ранее недоступным участком нуклеосомной ДНК после обработки PARP1;
- 6) траппинг PARP1 клиническими ингибиторами (олапариб, талазопариб, велипариб) и особенности действия ресвератрола.

Результаты выглядят логично связанными между собой и вписываются в современную картину о роли PARP1 в структуре хроматина и механизмах действия PARP-ингибиторов. В то же время в автореферате формулировки вывода нередко приближаются к обзору, и не всегда достаточно четко отделены прямые экспериментальные наблюдения от интерпретаций и более общих теоретических обобщений (например, обсуждение перспектив применения PARP1 в качестве модуля для эпигеномного редактирования и возможной синергии PARP-ингибиторов с иммунотерапией дано без явной привязки к собственным данным).

Публикации и апробация

По материалам диссертации опубликовано 7 работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ, включая статьи в журналах *Biomolecules*, *Cells*, *Acta Naturae* и Вестнике МГУ, серия 16. Это свидетельствует о высоком уровне исследований и их признании как в международном, так и в российском научном сообществе.

Результаты диссертации многократно апробированы на российских и международных конференциях, включая крупные форумы в области биохимической физики, молекулярной онкологии, структурной биологии и биоинженерии (BGRS/SB, FEBS, и др.), а также на ряде междисциплинарных мероприятий. Такой уровень апробации можно считать более чем достаточным, однако перечисление конференций в автореферате несколько перегружено деталями и могло бы быть более компактным при сохранении информативности

Вопросы и замечания

В разделе методологии указывается использование *spFRET*, гель-шифт анализа и других биофизических подходов, но параметры статистической обработки и критерии выделения субпопуляций по эффективности FRET описаны весьма кратко. Хотелось бы видеть более четкое указание, как определялись границы между субпопуляциями (например, высокие/средние/низкие E_{PR}) и как оценивалась статистическая значимость различий между условиями.

В автореферате подчеркивается универсальность реорганизующей активности PARP1 (независимость от последовательности, ПТМ, наличия линкеров и варианта гистонов), но вместе с тем отдельно акцентируется более выраженный эффект на H2A.Z-содержащих нуклеосомах. Было бы полезно яснее развести, где речь идет о качественной универсальности механизма, а где — о количественных различиях эффективности и аффинности.

В части, посвященной взаимодействию PARP1 с p53 и формированию комплекса с H2A.Z-содержащими нуклеосомами, в основном анализируется ДНК-связывающий домен p53 (p53DBD). Возникает вопрос, насколько полученные выводы можно напрямую переносить на полноразмерный p53 в клеточных условиях, учитывая роль С-концевого домена в регуляции специфичности и взаимодействий.

В описании влияния PARP1 на эффективность комплексообразования с dCas9 особый интерес представляет прикладной аспект – повышение доступности «закрытых» участков хроматина для CRISPR/dCas-конструктов. Однако в автореферате практически не обсуждается, какие ограничения могут возникнуть при переносе этих *in vitro*-результатов в клеточные системы (например, конкуренция с другими хроматин-ассоциированными белками, влияние динамики хроматина и проходят ли аналогичные эффекты при физиологических концентрациях белков).

При анализе действия ингибиторов PARP1 на нуклеосомных моделях приводятся данные о траппинге и различиях между олапарибом, талазопарибом и велипарибом, а также обсуждается соответствие этим наблюдениям клеточных эффектов. Было бы полезно чуть более явно обозначить, какие именно параметры (концентрации, соотношения фермента и нуклеосом, наличие субстрата) ближе всего воспроизводят клеточные условия и где, напротив, автор осознанно использует режимы, оптимальные для механистического анализа *in vitro*.

Оценка ингибирующей активности ресвератрола как «перспективного низкомолекулярного модулятора» основывается на данных *in vitro* о снижении аффинности PARP1 к нуклеосомной ДНК и подавлении авто-поли(АДФ-рибозил)ирования в субмикромольном диапазоне концентраций, при этом сам автор подчеркивает проблему агрегации ресвератрола при повышении концентрации. Хотелось бы более аккуратной формулировки, отделяющей продемонстрированные биофизические эффекты от еще не проведенной оценки фармакологических параметров (биодоступность, стабильность, специфичность).

Незначительные замечания

В целом автореферат написан грамотным научным языком, однако встречаются отдельные стилистические перегрузки: некоторые абзацы (особенно в разделе актуальности и обзора литературы) слишком объемны, содержат большое количество вводных конструкций и ссылок на разные направления (онкология, иммунотерапия, эпигеномное редактирование), что затрудняет восприятие. Имеются отдельные типографические и пунктуационные неточности, а также легкая непоследовательность в использовании терминов («пионерная функция», «пионероподобные свойства», «хроматин-реорганизирующая активность») без однозначного определения в начале.

В ряде мест рисунки и схемы в тексте автореферата (по описанию) выглядят перегруженными комментариями и аббревиатурами, что может затруднять их быстрое понимание без обращения к полному тексту диссертации. Возможно, для автореферата было бы целесообразно упростить подписи к рисункам и вынести части технических подробностей в основной текст диссертации.

Заключение

Несмотря на высказанные замечания, которые носят в основном уточняющий и стилистический характер и не умаляют научной ценности выполненного исследования, диссертация Кошкиной Дарьи Олеговны представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, выполненную на современном методическом

уровне с использованием передовых биофизических и биохимических подходов к изучению структуры хроматина. Работа вносит существенный вклад в понимание пионерной функции PARP1, его кооперации с p53, влияния на доступность нуклеосомной ДНК для CRISPR/dCas-систем, а также в механистическое осмысление действия синтетических и природных ингибиторов PARP1 на нуклеосомном уровне, что имеет как фундаментальное, так и прикладное значение для биомеханики, биоинженерии и молекулярной онкологии.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.1.10 «Биомеханика и биоинженерия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным Положением о присуждении ученых степеней Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; работа оформлена в соответствии с действующими требованиями к диссертациям и авторефератам. На основании изложенного соискатель Кошкина Дарья Олеговна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10 «Биомеханика и биоинженерия».

К.б.н., ведущий научный сотрудник Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Карпов Дмитрий Сергеевич

