

ОТЗЫВ

научного консультанта на диссертацию PhD-докторанта Куанбай Айгерим на тему: «Изучение роли Поли(АДФ-рибоза) полимераз *Arabidopsis thaliana* в ковалентной модификации концов разрывов в цепи ДНК *in vitro* и *in vivo*», представленную на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по специальности 6D060700 - Биология

Диссертационная работа посвящена исследованиям Поли(АДФ-рибоза)полимераз (PARP, Poly (ADP-ribose) Polymerases) зависимого ковалентного поли (АДФ-рибоз)илирования ДНК субстратов в условиях *in vitro* and *in vivo*. Растения перманентно подвергаются различным абиотическим и биотическим стрессам, негативно влияющим на их рост и продуктивность. Всё это, в первую очередь, отражается на клеточной ДНК, вызывая её повреждения на уровне модификаций азотистых оснований, сахаро-фосфатного остова и разрывов цепей ДНК. Репарационно дефицитные клетки неспособны обнаруживать и восстанавливать разрывы цепей ДНК, что как правило приводит к пагубным последствиям, таким как хромосомные aberrации, геномная нестабильность и гибель клеток под воздействием стресса. Сохранение целостности генома посредством удаления повреждений ДНК имеет важное значение как в зародышевой, так и в соматических клетках. Поли(АДФ-рибоз)илирование, также известное как ПАРилирование, представляет собой процесс пост-трансляционной модификации белков, при котором полимеры АДФ-рибозы ковалентно присоединяются к белкам мишеням с помощью ферментов Поли(АДФ-рибоза)полимераз (сокращенно PARP/ARTD). ПАРилирование регулирует организацию хроматина, репарацию ДНК, транскрипцию и репликацию и другие процессы. Поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP/ARTD) используют окисленную форму Никотинамид аденин динуклеотида (сокращенно НАД⁺) для катализа синтеза длинно-разветвленного полимера поли(АДФ-рибозы) (сокращенно ПАР), присоединенного к акцепторным аминокислотным остаткам ядерных белков. PARP ферменты связываются с одно- и двухцепочечными разрывами ДНК и активируют синтез ПАР который в свою очередь рекрутирует факторы репарации ДНК и ремоделирования хроматина.

ПАРилирование является обратимой модификацией, поскольку ПАР расщепляется до мономеров АДФ-рибозы с помощью ферментов поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазами (PARG), АДФ-рибозиларгинин-гидролазой 3 (ARH3) и терминальной АДФ-гликогидролазами (TARG1). PARG является основной гликогидролазой которая расщепляет ПАР в клетках млекопитающих и удаляет большую часть полимера ПАР, но оставляет один остаток АДФ-рибозы, прикрепленного к белку мишени. Массовый синтез ПАР является сигналом клеточной гибели в клетках млекопитающих, однако нет никаких экспериментальных доказательств того, относится ли это к растениям. Синтез и распад или оборот ПАР *in vivo* происходит очень быстро с периодом полураспада в несколько минут, что вместе с гибкой химической природой ПАР предполагает потенциальную регуляторную роль этого полианиона. В настоящее время ПАР признан важной сигнальной молекулой, которая регулирует функцию белка с помощью двух основных механизмов: ковалентного присоединения к белку-акцептору и высоко-специфических нековалентных взаимодействий, при которых размер и форма ПАР могут определять селективность взаимодействующих белков.

В отличие от систем млекопитающих, на удивление мало известно о ПАРилировании в растениях. Несмотря на то, что первая документация об активности PARP в ядрах растений была

сделана еще в конце 1970-х гг., многие исследования механизмов ПАРилирования и его значимости для физиологии растений были проведены лишь недавно.


В связи с этим считаю, что данная тема диссертационной работы по изучению роли растительных Поли(АДФ-рибоза) полимераз из *Arabidopsis thaliana* (сокращенно AtPARP1 и AtPARP2) в ковалентной модификации ДНК по концам разорванных цепей является актуальной и представляет большое научное и практическое значение.

В данной диссертационной работе Куанбай А.К. в биохимических экспериментах *in vitro*, обнаружила, что белки *A. thaliana* AtPARP1 и AtPARP2 могут напрямую АДФ-рибозилировать концевые фосфаты ДНК олигонуклеотидов. AtPARP1 преимущественно катализирует ковалентное присоединение звеньев АДФ-рибозы к концевым фосфатам ДНК дуплексов с выемкой, содержащих 5'-концевой фосфат. AtPARP2 преимущественно (АДФ-рибоз)илирует дуплексы ДНК с разрывами/брешью, содержащие 5'-концевой фосфат на двухцепочечных концах. Гликогидролаза (PARG) восстанавливала нативную структуру ДНК путем гидролиза ПАР, а также аддуктов ПАР-ДНК, генерируемых AtPARP1 и AtPARP2. Биохимический и масс-спектрометрический анализы продуктов реакции ПАР-ДНК позволили предположить, что AtPARP используют концевые отстатки на разорванных цепях ДНК в качестве альтернативы 2'-гидроксильной части АДФ-рибозы и остаткам белкового акцептора для катализа инициации цепи ПАР либо через 2',1'-О-гликозидную рибозо-рибозную связь, либо через образование фосфодиэфирной связи между С1' АДФ-рибозы и фосфатом концевого дезоксирибонуклеотида. Этот новый тип пострепликативной модификации ДНК обеспечивает новое понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе биологических явлений АДФ-рибозилирования, опосредованного AtPARP растений.

Данная работа является трудоемкой, поскольку требует выполнения ряда сложных работ от выделения генов из *Arabidopsis thaliana* для экспрессии и выделения рекомбинантных белков до проведения биохимических реакции с использованием радиоактивных изотопов фосфата. Несмотря на это, Куанбай А.К. смогла решить все поставленные задачи, которые были изначально спланированы и достичь поставленной цели исследования. В целом работа хорошо изложена и представляет интерес для научного общества. Данные результаты подтверждают готовность Куанбай А.К. стать PhD докторантом, так как она показала, что обладает необходимыми теоретическими знаниями и владеет многими методами работы в областях генной инженерии, молекулярной биологии и биохимии.

Важно отметить что, диссертационная работа имеет огромное теоретическое и практическое значение, которые были отражены в 10 печатных работах, в том числе 1 статьи и 2 тезиса в журналах с ненулевым импакт-фактором входящий в базу данных Web of Science или Scopus, 4 статей в республиканских научных изданиях, рекомендуемых ККСОН МОН РК, и 3 тезисов в материалах международных конференций.

Считаю, что рассматриваемая диссертационная работа соответствует всем требованиям для PhD докторской диссертации на соискание ученой степени доктора философии (PhD). Данная диссертация полностью готова для защиты.


UMR9019 CNRS
INTEGRITE DU GENOME ET CANCERS
GUSTAVE ROUSSY
Pavillon de Recherche 2
114 rue Edouard Vaillant
94805 VILLEJUIF CEDEX
Tél. : 01 42 11 51 18/42 35

Научный консультант:
PhD, профессор института
Густава Русси (Вильжюиф, Франция)

Сапарбаев М.К.