

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Хороненковой Светланы Владимировны «Роль киназы АТМ в координации клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК каскадом посттрансляционных модификаций», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности «03.01.04 – биохимия»

Одним из основополагающих принципов передачи и хранения генетической информации является стабильность генома. Для реализации этого принципа природа создала разветвленную систему защиты от многочисленных факторов, вызывающих разнообразные повреждения структуры ДНК. В клетках имеется значительное количество систем, распознающих эти повреждения, сигнализирующих о своем присутствии и осуществляющих ликвидацию нарушений. В этих процессах участвует огромное количество внутриклеточных факторов, а совокупность этих процессов получила название репарации ДНК. Исследования репарации проводятся уже многие десятилетия, однако многие ее аспекты, в первую очередь процессы клеточного ответа на различные типы повреждений ДНК и механизмы их регулирования пока еще изучены совершенно недостаточно. Между тем понимание этих процессов является чрезвычайно важным, так как повреждения ДНК лежат в основе различных заболеваний, в первую очередь злокачественных перерождений клетки. В связи с этим работы высокого уровня, выполненные в данной области являются весьма актуальными и своевременными.

Диссертационная работа С.В.Хороненковой относится к числу таких исследований. Выполненная в одном из ведущих мировых научных центров, по степени важности и достоверности полученных результатов она без сомнений может быть отнесена к числу выдающихся.

Основной целью работы С.В. Хороненковой являлось исследование молекулярных механизмов клеточного ответа на однонитевые разрывы ДНК, и выявление сигнальных путей, ферментов и их каскадов, участвующих в репарации. Выбор однонитевых разрывов (ОР) в качестве типа повреждений ДНК, убедительно обоснован во введении и литературном обзоре диссертации. ОР являются наиболее распространенным типом повреждений ДНК, препятствующих процессам репликации и транскрипции и являются основным источником еще более мутагенных двунитевых разрывов ДНК либо при репликации, либо в случае их близкого расположения на противоположных цепях ДНК. Полное отсутствие репарации ОР является летальным для организма, а дефекты репарации ОР связаны с заболеваниями нервной и сердечно-сосудистой системы, метаболическими дефицитами и в значительной степени онкологией. Несмотря на очевидную важность восстановления ОР, механизмы клеточного ответа на ОР изучены мало.



Диссертационная работа С.В. Хороненковой имеет традиционное построение и содержит 268 страниц текста, 83 рисунка и 10 таблиц. Список цитированной литературы включает 633 источника.

Во введении рассматривается актуальность и важность выбранной темы. Автор обсуждает тематику работы в рамках современных проблем и достижений биохимии и биомедицины. В качестве задач диссертационного исследования ставится биохимическое выявление ферментов-сенсоров, -преобразователей и -эффекторов клеточного ответа на ОР, механизмов их внутриклеточной регуляции в отсутствие стресса и в ответ на повреждения ДНК и молекулярных механизмов взаимной регуляции процессов распознавания и сигнализации ОР со своевременным восстановлением поврежденных структуры ДНК.

В обзоре литературы рассматриваются причины нестабильности ДНК и типы возникающих повреждений. Значительное внимание уделено последствиям отсутствия их восстановления. В обзоре подробно обсуждаются последние литературные данные о механизмах восстановления повреждений азотистых оснований и разрывов цепей ДНК и их первостепенная важность в обеспечении стабильности генома. Рассматриваются сенсоры и преобразователи клеточного ответа на разрывы ДНК, в большей степени двуниевые (ДР), поскольку именно данный механизм в настоящее время наиболее исследован. Отдельный раздел посвящен механизмам действия киназы АТМ, которая является одним из традиционных ферментов-преобразователей клеточного ответа на ДР, а также рассматриваются признаки и причины синдрома Луи-Бара, который обусловлен мутациями в гене *АТМ*. Данный раздел подготавливает читателя к открытию важной роли киназы АТМ в клеточном ответе на ОР, сделанном в диссертации. В заключение главы кратко обсуждаются ограниченные литературные данные о регуляции эффективности системы восстановления повреждений оснований ДНК и ОР. Здесь выдвигается гипотеза о существовании системы клеточного ответа на ОР классического типа: распознавание ОР, сигнализация и восстановление повреждения. Здесь же обосновывается и подход к исследованию такой системы: эффективность репарации ОР зависит от ядерной концентрации ДНК-полимеразы  $\beta$ , которая регулируется Е3-убиквитинлигазой MULE в ответ на повреждения ДНК. Как следствие, исследования предлагается начать с исследования механизма регуляции MULE в нормальных условиях и после стимуляции образования повреждений ДНК. Обзор хорошо структурирован, содержит удачные схемы и иллюстрации и написан хорошим научным языком и в целом производит приятное впечатление своей лаконичностью и ясностью изложения.

Раздел «Материалы и методы» подробно описывает детали и инструментарий проведенных экспериментов. Автор использовал несколько клеточных линий человека различного происхождения: раковые, нормальные и полученные от пациентов с синдромом Луи-Бара. Помимо работы с клеточными линиями в диссертации выполнен ряд

экспериментов *in vitro*. В исследовании использован широкий набор биохимических, биофизических и молекулярно-биологических методов исследования - экспрессия рекомбинантных белков с посттрансляционными модификациями в бакуловирус-инфицированных клетках насекомых, фракционирование цельных клеточных экстрактов с целью выделения специфических киназных и фосфатазных активностей, остроумно примененные методы ДНК-комет, цитометрии и сопряженного с конфокальной микроскопией иммунофлуоресцентного анализа для анализа повреждений ДНК и многие другие методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками. Данный раздел свидетельствует о высокой квалификации и прекрасной методической подготовке С.В. Хороненковой как ученого-экспериментатора.

Главы «Результаты» и «Обсуждение результатов» написаны четко и логично. В первой части данного раздела описаны эксперименты по исследованию механизма регуляции клеточной концентрации E3-убиквитинлигазы MULE. Показано, что в ответ на повреждения ДНК наблюдается снижение клеточной концентрации MULE. Важность данного наблюдения для процесса жизнедеятельности клетки подтверждена в экспериментах с клетками, суперэкспрессирующими MULE. Показано, что такие клетки имеют пониженную активацию p53 и сниженную эффективность репарации повреждений оснований ДНК и ОР за счет недостаточной ядерной локализации ДНК-полимеразы  $\beta$ . Таким образом, автором авторитетно установлено существование системы регуляции эффективности репарации повреждений ДНК и ОР, которая осуществляется через убиквитилирование.

Далее автор описывает решение целого ряда последовательных задач по выяснению последовательности молекулярных событий от распознавания ОР (и повреждений оснований ДНК) до регуляции эффективности восстановления этих повреждений, которая контролируется MULE.

При выяснении механизма регуляции MULE показано, что активность убиквитин-протеазы USP7, а точнее ее изоформы USP7S, противопоставлена самомодификации MULE убиквитином. Причем, в ответ на повреждения ДНК наблюдается снижение клеточной концентрации USP7S и потому снижение концентрации MULE за счет убиквитилирования, и более эффективное исходной структуры ДНК. Автор затем ставит вопрос о механизме регуляции концентрации USP7S в ответ на повреждающий ДНК стресс. При решении данной задачи установлено, что время полужизни USP7S регулируется фосфорилированием по серину 18: фосфорилированный фермент имеет гораздо более высокую стабильность (а также и активность) в клетках. В соответствии с этим, С.В.Хороненковой экспериментально показано, что вышеупомянутое снижение клеточной концентрации USP7S после генотоксической обработки клеток происходит за счет снижения фракции фосфорилированного USP7S. Непринципиальным замечанием к этой



части работы является отсутствие каких-либо физико-химических данных о причинах пониженной стабильности и активности нефосфорилированного USP7S.

Дальнейшая логика исследования потребовала ответа на вопрос, какие ферменты отвечают за фосфорилирование и дефосфорилирования серина 18 в USP7S. Для этого С.В.Хороненкова использовала классический биохимический подход фракционирования клеточных экстрактов в сопряжении с реакциями для оценки киназной и фосфатазной активности фракций *in vitro*, в которых субстратом является дефосфорилированный или фосфорилированный USP7S, соответственно. В результате была установлена роль фосфатазы PPM1G и киназы CK2 в регуляции фосфорилирования USP7S, а также показано, что фосфорилирование убиквитин-протеазы киназой CK2 не регулируется в ответ на генотоксический стресс, тогда как фосфатазная активность PPM1G в этих условиях возрастает. Наконец, установлено, что активность PPM1G регулируется фосфорилированием данной фосфатазы киназой ATM в ответ на повреждения ДНК. Таким образом, автором убедительно показано, что клеточный ответ на ОР регулируется киназой ATM, и выяснены ферментные каскады, в данный ответ вовлеченные.

Далее рассматривается вопрос о функции ATM в ответе клетки на ОР. Как упоминалось выше, киназа ATM является регулятором клеточного ответа на ДР, потому в своих экспериментах автор проводит обработку клеток человека агентами, вызывающими либо повреждения оснований ДНК, либо напрямую ОР, и оценивает активность киназы ATM. Одновременно с этим автор использует обширный набор методов для исключения присутствия ДР в экспериментальной системе. Результатом данной части работы является заключение об активации киназной функции ATM в ответ на ОР. В этом же разделе экспериментально показана связь ОР, активности ATM и вышеописанного ферментного каскада клеточного ответа на ОР: в клетках из пациентов с синдромом Луи-Бара не наблюдается регулируемой p53 задержки клеточного цикла перед репликацией ДНК, а эффективность репарации таких клеток значительно снижена по сравнению с контрольными.

Наконец, в заключительной небольшой по объему главе раздела «Результаты» показано, что повышение активности ATM в ответ на ОР не зависит от ряда белковых факторов, которые необходимы для регуляции активности ATM после образования ДР. Установлено, что сенсором ОР в данном контексте является поли(АДФ-рибозо)полимераза PARP1, поскольку в отсутствие PARP1 повышения активности ATM в ответ на ОР не наблюдается. Это важный раздел, поскольку в нем осуществляется четкое разделение клеточного ответа на ОР и роли киназы ATM в этом ответе и других клеточных функций данного фермента, в том числе в ответе клетки на ДР.

В «Обсуждении результатов» С.В. Хороненковой обобщаются полученные данные по выяснению ферментного каскада клеточного ответа на ОР. Обсуждается функция отдельных ферментов в этом каскаде с учетом современных знаний и четко описывается

значительная научная новизна исследования. Важно то, что функция всех рассмотренных выше ферментов (за исключением ДНК-полимеразы  $\beta$ , MULE и PARP1) в ответе клетки на ОР является совершенно новым материалом. Именно поэтому важной и чрезвычайно удачной частью данного раздела является обсуждение подходов к ингибированию ряда исследованных ферментов для химиотерапии раковых заболеваний. В качестве замечания хочется отметить практически полное отсутствие подобного обсуждения для случая ATM, несмотря на то, что исследования по разработке ингибиторов активности ATM ведутся во многих лабораториях мира и фармацевтических компаниях.

В заключение автор подводит итоги исследования и чрезвычайно удачно схематически и иллюстративно описывает выявленную в работе многостадийную систему клеточного ответа на ОР с участием ферментов PARP1, ATM, PPM1G, USP7S, MULE, HDM2, p53 и ДНК-полимеразы  $\beta$ .

Сформулированные С.В.Хороненковой выводы работы основаны на результатах многочисленных экспериментов, причем в большинстве случаев автором использованы различные клеточные модели и взаимозаменяемые экспериментальные подходы. В целом достоверность результатов работы и обоснованность выводов не вызывают сомнения.

Работа С.В. Хороненковой хорошо оформлена, написана ясным научным языком и успешно проиллюстрирована. Содержание автореферата диссертации полностью соответствует содержанию работы. Исследование выполнено на высоком научном экспериментальном и теоретическом уровне. Как уже было отмечено, подавляющее большинство полученных результатов являются абсолютно новыми и потому имеют высокую актуальность, фундаментальную значимость и научную новизну. С учетом важности проведенных исследований для медицины и фармацевтики высокая практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнения. Сделанные по работе замечания не носят принципиального характера и не влияют на основные результаты и выводы диссертации.

Основные результаты работы опубликованы в 15-ти статьях в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ, с высоким фактором импакт (*Molecular Cell*, *PNAS*, *EMBO Journal* и других). Материалы работы также были представлены на 10-ти международных конференциях.

Таким образом, анализ диссертационной работы С.В. Хороненковой свидетельствует о ее завершенности и разработке в рамках данного исследования ряда теоретических положений, которые в совокупности можно квалифицировать как новое крупное научное достижение. На основании научной новизны, высокой актуальности и теоретического и практического значения полученных результатов считаю, что диссертационная работа «Роль киназы ATM в координации клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК каскадом посттрансляционных модификаций» полностью удовлетворяет требованиям Постановления Правительства Российской Федерации от 24



сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор, Хороненкова Светлана Владимировна, заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности «03.01.04 – биохимия».

Заведующий лабораторией молекулярных основ  
действия физиологически активных соединений  
ФГБУН Институт молекулярной биологии  
имени В. А. Энгельгардта РАН  
член-корреспондент РАН,  
доктор химических наук, профессор



Кочетков Сергей Николаевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ФГБУН ИМБ РАН)  
ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32  
Тел. +7(499) 135-05-90 email: kochet@imb.ru

9 июня 2017 г.

