

*На правах рукописи*



ХОРОНЕНКОВА Светлана Владимировна

**РОЛЬ КИНАЗЫ АТМ В КООРДИНАЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА  
НА ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК  
КАСКАДОМ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ**

03.01.04 – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора химических наук

Москва - 2017

Работа выполнена в лаборатории репарации ДНК Института радиационной онкологии Оксфордского университета (заведующий лабораторией - доктор биологических наук, профессор Г.Л. Дианов) и завершена в докторантуре Химического факультета (кафедра химической энзимологии) Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (научный консультант - доктор химических наук, профессор В.И. Тишков)

**Научный консультант:** **Тишков Владимир Иванович**, доктор химических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Лаврик Ольга Ивановна**, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

**Кочетков Сергей Николаевич**, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук

**Георгиева София Георгиевна**, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией транскрипционной регуляции эукариот Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «04» июля 2017 года в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М. В. Ломоносова по адресу: Москва, Ломоносовский проспект, д.27 и на сайте Химического факультета МГУ <http://www.chem.msu.ru>.

Автореферат диссертации размещён на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: [vak.ed.gov.ru](http://vak.ed.gov.ru).

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» апреля 2017 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 501.001.59,  
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК<sup>1</sup>) химически нестабильна (в том числе в физиологических условиях), и результатом подобного феномена является образование десятков и даже сотен тысяч эндогенных повреждений ДНК на геном в сутки [Lindahl T., 1993<sup>2</sup>]. В дополнение к этому действие многочисленных физических и химических факторов окружающей среды провоцирует образование экзогенных повреждений ДНК. Несмотря на неотъемлемую роль динамической природы ДНК в процессе эволюционной изменчивости, ее повреждения препятствуют нормальному протеканию жизненно важных процессов репликации генетического материала и транскрипции, приводя к нарушениям экспрессии генов и в ряде случаев гибели клеток. Повреждения ДНК также являются источником мутаций и, как следствие, нестабильности генома и ассоциированных патологических состояний, включающих нейродегенеративные и онкологические заболевания, а также старение клеток и организма в целом. Для поддержания целостности клеточного генома и предотвращения преждевременного старения и злокачественного перерождения клетки располагают широким набором защитных механизмов, включающих системы репарации ДНК. Функция последних заключается в устранении повреждений ДНК, а также коррекции мутаций, вызванных действием эндогенных и экзогенных мутагенов. Однако выполнение подобной функции не ограничивается лишь репарацией ДНК: для поддержания целостности генома необходима совокупность действия систем распознавания повреждений ДНК, передачи сигнала от поврежденной ДНК к различным белкам, обеспечивающим комплексный клеточный ответ на генотоксический стресс, включая ферменты репарации, и, наконец, непосредственно репарации ДНК. Необходимой частью подобной схемы регуляции являются также и системы уничтожения целых клеток в случае невозможности своевременной и качественной репарации их генетического материала с целью предотвращения злокачественного перерождения. Координированное действие вышеупомянутых систем иначе называется

---

<sup>1</sup> В настоящей работе приняты следующие сокращения: ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, ДР и ОР – дву- и одноцепочечные разрывы ДНК, ЭРО – эксцизионная репарация оснований ДНК, PAR – полимеры ADP-рибозы, POL β – ДНК-полимераза β, USP7<sub>total</sub> – все изоформы USP7, USP7S – S18-содержащая изоформа деубиквитин-специфической протеазы USP7, pUSP7S – S18-фосфорилированная форма USP7S, CK2 – казеин-киназа 2, pATM - S1981-фосфорилированная форма ATM, А-Т – атаксия телеангиэктазия, ММС – метилметансульфонат, ИР – ионизирующая радиация, киРНК – короткие интерферирующие рибонуклеиновые кислоты.

<sup>2</sup> Смотри список литературы диссертации

клеточным ответом на повреждения ДНК и является обязательным свойством нормальной (непатологической) клетки.

Несмотря на низкую частоту возникновения спонтанных двуцепочечных разрывов ДНК (ДР, 10-20 ДР на геном человека в сутки), единственными относительно широко исследованными в последние годы являются системы клеточного ответа именно на данный тип повреждений ДНК [Jackson S.P. & Bartek J., 2009]. Это связано с высокой мутагенностью ДР, а также существованием прямых экспериментальных доказательств взаимосвязи дефектов их репарации и сигнализации с развитием раковых заболеваний [Bartkova J. *et al.*, 2005]. В отличие от ДР, число спонтанно возникающих одноцепочечных разрывов ДНК (ОР), также образующихся в качестве интермедиатов репарации повреждений оснований ДНК, феноменально и составляет порядка 15 000-20 000 повреждений ДНК на геном человека в сутки. Нерепарированные ОР являются основным источником репликационных ДР и препятствуют эффективной транскрипции ДНК, и мутации/изменение уровня экспрессии генов ферментов эксцизионной репарации оснований (ЭРО) и ОР-репарации характерны, хотя и более редки по сравнению с белками репарации ДР, для высокого процента раковых опухолей различной природы [Maynard S. *et al.*, 2009]. Более того, дефекты репарации ОР являются причиной ряда прогрессивных нейродегенеративных заболеваний и вносят значительный вклад в процесс старения клетки [Caldecott K.W., 2008; Pan M.-R. *et al.*, 2016]. Таким образом, исследование совокупности действия систем детекции, сигнализации, координации с другими клеточными процессами и репарации ОР является чрезвычайно актуальной задачей. Действительно, очевидная важность своевременной и эффективной репарации эндогенных ОР обеспечила широкомасштабное исследование механизмов их детекции и репарации [Caldecott K.W., 2008]. Несмотря на это, концепции существования внутриклеточной системы передачи сигнала от сенсоров ОР к системам их репарации и координации ОР-репарации с прогрессией клеточного цикла, или, другими словами, системы клеточного ответа на ОР до настоящей работы предложено не было. Отметим, что в случае клеточного ответа на ДР значительная роль отводится посттрансляционным модификациям вовлеченных в процесс белков, механизмы регуляции которых только начинают проясняться. Потому чрезвычайно актуальным является вопрос не только о собственно существовании системы клеточного ответа на ОР, но и о выявлении белков, вовлеченных в данный процесс, молекулярных механизмов их регуляции и возможной регуляторной роли посттрансляционных модификаций в клеточном ответе на ОР.

Системы сигнализации нерепарированных повреждений ДНК и их репарации присутствуют и в опухолевых клетках, где они противодействуют терапевтическому эффекту средств, используемых при лечении раковых заболеваний, таких, например, как ионизирующее облучение и химиотерапия. В настоящее время одним из важнейших препятствий к успешной разработке принципиально новых подходов к терапии раковых заболеваний является фундаментальный пробел в знаниях о молекулярных каскадах, ответственных за передачу сигнала от ОР к системам их репарации и координации репарации ДНК с другими клеточными процессами. Таким образом, идентификация и исследование системы клеточного ответа на ОР имеют высокую актуальность и значимость.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы явились выявление и детальное исследование молекулярных механизмов клеточного ответа на нерепарированные ОР и белков, вовлеченных в их реализацию.

В ходе исследования были поставлены и успешно решены следующие задачи:

1. Проверить возможность существования негативной регуляции уровня экспрессии E3-убиквитинлигазы MULE, контролирующей содержание белков-эффекторов клеточного ответа на ОР опухолевого супрессора p53 и ДНК-полимеразы  $\beta$  (POL  $\beta$ ), в зависимости от эффективного уровня повреждений ДНК в клетках. Установить биохимическую значимость и механизм подобной регуляции.
2. Выяснить механизм регуляции стационарного содержания E3-убиквитинлигазы MULE, которая обеспечивает координацию репарации ОР с прогрессией клеточного цикла.
3. Выявить функциональную значимость неосновной изоформы убиквитин-специфической протеазы USP7 (USP7S) и изучить роль посттрансляционной модификации уникального для USP7S остатка серина 18 в регуляции стационарного уровня содержания фермента.
4. Провести биохимическую идентификацию белков, ответственных за фосфорилирование и дефосфорилирование остатка S18 в USP7S.
5. Исследовать возможность регуляции активности и/или стабильности, и/или комплексообразования с субстратом киназы и фосфатазы, ответственных за контроль статуса S18-фосфорилирования USP7S, в зависимости от количества нерепарированных ОР. Выяснить механизм подобной регуляции.
6. Идентифицировать белок-преобразователь, контролирующий клеточный сигнальный каскад в ответ на ОР, и выявить его биохимическую роль в координации прогрессии клеточного цикла и эффективности ОР-репарации. Выявить белок-сенсор,

обеспечивающий детекцию нерепарированных ОР и передачу сигнала преобразователю. Исследовать функциональную взаимозависимость каскада сигнализации нерепарированных ОР с клеточными системами, реализуемыми в ответ на генотоксический стресс других типов (ДР и окислительный стресс).

7. Обосновать биохимическую значимость существования системы клеточного ответа на нерепарированные ОР и продемонстрировать последствия нарушений регуляции подобной системы.

**Научная новизна.** В рамках настоящей работы была впервые предложена и подтверждена фундаментальная концепция существования внутриклеточной системы передачи сигнала от сенсоров ОР к системам их репарации и координации ОР-репарации с прогрессией клеточного цикла, также называемой системой клеточного ответа на нерепарированные одноцепочечные разрывы ДНК. Были проведены систематические исследования по биохимической идентификации белков, вовлеченных в клеточный ответ на нерепарированные ОР, и продемонстрировано, что подобная система является фундаментальным свойством нормальной клетки человека, обеспечивающим поддержание целостности генома.

В ходе исследования было впервые выявлено кратковременное снижение клеточного уровня содержания E3-убиквитинлигазы MULE в ответ на повреждения ДНК. Подобная регуляция уровня экспрессии MULE обеспечивает повышение эффективности ЭРО и ОР-репарации через стабилизацию ДНК-полимеразы  $\beta$ , а также запуск p53-зависимого ответа на повреждения ДНК. При исследовании предшествующего пути передачи сигнала от ОР к MULE был установлен механизм регуляции стабильности MULE балансом процессов самоубиквитинирования и деубиквитинирования специфической S18-содержащей изоформой USP7S убиквитин-специфической протеазы USP7. Было впервые показано, что USP7S не является основной по клеточному содержанию изоформой USP7 (3-5 % от общего уровня фермента), имеет высокий эндогенный уровень фосфорилирования аминокислотного остатка S18 (60-80 %) и является основным среди всех изоформ USP7 регулятором стабильности не только MULE, но и E3-убиквитинлигазы HDM2, субстратом которой также является p53. В рамках исследования было впервые установлено, что фосфорилирование остатка S18 в USP7S осуществляется конститутивно киназой 2 (CK2) и что данное фосфорилирование необходимо для поддержания стабильности и активности фермента, тогда как ответом на ОР является дефосфорилирование USP7S по

остатку S18, которое и обеспечивает кратковременное снижение стабильности MULE (и HDM2). Биохимическая идентификация фосфатазы, ответственной за дефосфорилирование остатка S18 в USP7S, позволила впервые установить значимую роль PPM1G в координации клеточного ответа на ОР, вышестоящим положительным регулятором которой являлась киназа ATM. Наконец, в рамках настоящего исследования было впервые показано, что ответом на нерепарированные ОР является PARP1-зависимая индукция активности киназы ATM. Явление ОР-зависимой активации ATM является принципиально новой концепцией и значительно расширяет существующие представления о канонической роли ATM в качестве белка-преобразователя в клеточном ответе лишь на ДР, указывая на еще более значимую по сравнению с описанной ранее роль данного фермента в качестве стража целостности генома.

Обобщая, в рамках настоящей работы было впервые постулировано существование фундаментально важной системы клеточного ответа на нерепарированные ОР, представляющей собой регулируемый рядом последовательных посттрансляционных модификаций сигнальный каскад: PARP1—ATM—PPM1G—USP7S—MULE и HDM2—p53 и POI β. Представлен ряд важнейших результатов по функции отдельных белков и роли описанного выше сигнального пути в обеспечении координации эффективной репарации ОР и p53-зависимой задержки клеток с нерепарированными ОР в фазе G<sub>1</sub> клеточного цикла. Биохимическая значимость открытой в рамках настоящей работы системы клеточного ответа на нерепарированные ОР заключается в обеспечении эффективной и своевременной репарации ОР в фазе клеточного цикла G<sub>1</sub> с целью предотвращения образования репликационных ДР и поддержания целостности генома клетки. Нарушения клеточного ответа на ОР вносят значительный вклад в развитие ряда патологических состояний, одним из примеров которых является фенотип нестабильности генома в ATM-дефицитных клетках пациентов с заболеванием атаксия телеангиэктазия.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В данном исследовании был получен ряд приоритетных научных результатов, свидетельствующих о ранее неизвестной фундаментальной роли набора белков, включающих S18-содержащую изоформу убиквитин-специфической протеазы USP7S, фосфатазу PPM1G и киназу ATM, в координации эффективности системы ЭРО и ОР-репарации и прогрессии клеточного цикла, то есть временных рамок такой репарации ДНК. Полученные впервые экспериментальные данные о значимой функции PPM1G в поддержании целостности генома в ответ на изменения

количества нерепарированных ОР указывают на возможную роль данной фосфатазы в качестве супрессора злокачественной трансформации клеток и предполагают обнаружение инактивирующих функцию PPM1G мутаций в клетках раковых опухолей с p53 дикого типа.

Раскрыта ключевая роль киназы ATM в координации своевременной и эффективной репарации ОР в соответствии с многоступенчатым сигнальным каскадом, регулируемым посттрансляционными модификациями. Совокупность результатов данной работы по активации ATM нерепарированными ОР, а также сделанных другими исследователями выводов последних 3-4 лет об индукции активности ATM в ответ на инсулиновый и окислительный стресс и кислородное голодание указывают на значительно более широкую, чем представлялось до недавнего времени, роль киназы в поддержании клеточного гомеостаза.

Открытие многоступенчатого сигнального каскада, обеспечивающего ATM-зависимую передачу сигнала о присутствии в клетке нерепарированных ОР от сенсора данного типа повреждений ДНК PARP1 к эффекторам их своевременной репарации p53 и ДНК-полимеразе  $\beta$ , вносит фундаментальный вклад в наше понимание молекулярных механизмов клеточного ответа на ОР и важнейшей роли эффективной и своевременной репарации ОР в поддержании целостности генома человека и имеет высокую практическую ценность для информированной разработки новых высокоэффективных подходов к терапии раковых заболеваний.

**Методология и методы исследования.** В работе использовали широкий ряд культивируемых клеточных линий человека нормального и ракового происхождения. Все основные экспериментальные результаты были получены в клетках нормальных первичных фибробластов и воспроизведены в одной и более клеточных линиях ракового происхождения с целью исключения специфичности наблюдаемого эффекта в зависимости от типа клеток. В ходе исследования использовали широкий спектр современных методов биохимии, биофизики, молекулярной и клеточной биологии, включающих модуляцию уровней экспрессии генов путем трансфекции клеток плазмидной ДНК и короткими интерферирующими рибонуклеиновыми кислотами (киРНК) и активности ферментов с использованием специфических ингибиторов, анализ экспрессии генов, клеточного уровня содержания и активности ферментов методами обратной транскрипции РНК и полимеразной цепной реакции в реальном времени, иммуноблотинга и реакций *in vitro*, соответственно, модуляцию и анализ уровня повреждений ДНК методами гель-



электрофореза единичных клеток, иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии, методы биохимической идентификации ферментов, ответственных за посттрансляционные модификации специфических аминокислотных остатков субстратов, при многоступенчатом хроматографическом фракционировании клеточного содержимого с последующим анализом фракций тандемной масс-спектрометрией и другие методики.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Кратковременное снижение клеточного содержания E3-убиквитинлигазы MULE в ответ на повреждения ДНК обеспечивает стабилизацию вовлеченной в репарацию ДНК-полимеразы  $\beta$  (POL  $\beta$ ) и супрессора опухолевого роста p53, контролирующего регуляцию прогрессии клеточного цикла.
2. Стационарный уровень содержания MULE регулируется балансом процессов самоубиквитинилирования и деубиквитинилирования специфической S18-содержащей изоформой USP7S убиквитин-специфической протеазы USP7. Пониженная стабильность MULE в ответ на ОР обеспечивается кратковременным снижением экспрессии USP7S.
3. USP7S составляет незначительную долю общего содержания всех изоформ фермента (3-5 %), являясь основным регулятором E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2. Большая часть (60-80 %) убиквитин-специфической протеазы USP7S конститутивно фосфорилирована по остатку серина 18 в неповрежденных клетках. Данная посттрансляционная модификация обеспечивает высокий уровень стабильности и активности фермента.
4. Казеин-киназа 2 и фосфатаза PPM1G обеспечивают фосфорилирование и дефосфорилирование остатка S18 в USP7S, соответственно. Фосфорилирование S18 в USP7S казеин-киназой 2 является конститутивным.
5. Киназа ATM фосфорилирует PPM1G в ответ на нерепарированные ОР, что индуцирует фосфатазную активность PPM1G. Активация PPM1G приводит к дестабилизации и снижению активности USP7S и соответствующему снижению уровня экспрессии MULE.
6. Активность киназы ATM стимулируется нерепарированными ОР эндогенной и экзогенной природы и зависит от PARP1-зависимого синтеза поли(ADP-рибозы). ОР-зависимая активация ATM происходит в отсутствие ДР и не зависит от компонентов MRE11-RAD50-NBS1 комплекса или образования дисульфидных связей при окислении остатков цистеина, характерных для известных механизмов индукции активности ATM.
7. ATM играет ключевую роль в координации своевременной и эффективной репарации ОР в рамках многоступенчатого сигнального каскада, регулируемого посттрансляционными

модификациями: PARP1—ATM—PPM1G—USP7S—MULE и HDM2—p53 и POL β. Активация ATM нерепарированными ОР обеспечивает p53-зависимую задержку входа клеток с поврежденной ДНК в фазу S клеточного цикла и POL β-зависимую стимуляцию эффективности ОР-репарации, предотвращая образование мутагенных репликационных ДР и поддерживая целостность генома.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность экспериментальных данных обеспечена использованием обширного комплекса современных методов исследования, ряда независимых экспериментальных моделей и необходимых положительных и отрицательных контролей. Все эксперименты проводили в трех и более независимых повторах и для анализа данных использовали адекватные и современные методы статистической обработки. В ряде случаев полученные в настоящей работе результаты были хронологически позже подтверждены данными отечественных и зарубежных исследований (смотри главу 4 “Обсуждение результатов” диссертации).

Основные результаты диссертационной работы были представлены к обсуждению мировым научным сообществом в виде устных и постерных докладов на российских и международных конференциях: “56<sup>th</sup> Annual Meeting of the Radiation Research Society” (США, 2010), “Charles Rodolphe Brupbacher Symposium on Cancer Genome and DNA Repair” (Швейцария, 2011), “6<sup>th</sup> International Workshop on Mdm2” (США, 2011), “6<sup>th</sup> DNA repair workshop” (Словакия, 2012), “3<sup>rd</sup> Erling Seeberg Symposium on DNA Repair” (Норвегия, 2012), международная конференция “Биокатализ-2013: Фундаментальные основы и применение” (Россия, 2013), “Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society” (Великобритания, 2014), “5<sup>th</sup> US-EU International Conference on Repair of Endogenous DNA Damage” (США, 2014), “Tomas Lindahl Conference on DNA Repair” (Норвегия, 2015), “Benzon Symposium on Genome Instability and Neurodegeneration (no. 62)” (Копенгаген, 2016).

Апробация диссертационной работы прошла 24 марта 2017 г. на заседании кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова и включена в качестве пленарного доклада в научную программу Международной конференции “Биокатализ-2017: Фундаментальные основы и применение” (Москва, 2017).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 25 печатных работ: 15 статей (все в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ) и 10 тезисов докладов международных конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав (“Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты” и “Обсуждение результатов”), заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 268 страницах, содержит 83 рисунка, 10 таблиц и 633 источника литературы.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Регуляция эффективной ядерной концентрации ДНК-полимеразы  $\beta$  (POL  $\beta$ ), которая является лимитирующим фактором ЭРО и ОР-репарации [Parsons J.L. *et al.*, 2005c], осуществляется в зависимости от эффективного уровня повреждений ДНК. В эндогенных условиях моноубиквитинирование POL  $\beta$  при действии E3-убиквитинлигазы MULE с последующим CHIP-зависимым полиубиквитинированием обеспечивает деградацию излишка новосинтезированного фермента, не вовлеченного в репарацию ДНК [Parsons J.L. *et al.*, 2009]. Нами было показано, что в случае длительного существования нерепарированных повреждений ДНК экспрессия гена супрессора опухолевого роста *p14ARF* возрастает, приводя к накоплению активного белка в цитоплазме и последующему ингибированию E3-убиквитинлигирующей активности MULE [Orlando G. *et al.*, 2014]. В результате большее количество POL  $\beta$  избегает протеасомной деградации и релокализуется в ядро, обеспечивая необходимую интенсификацию репарации ДНК. Результатом эффективной репарации повреждений ДНК является пониженное накопление ARF в цитоплазме, активация MULE и протеасомной деградации POL  $\beta$  и замыкание цикла регуляции POL  $\beta$ -зависимой эффективности ЭРО и ОР-репарации в зависимости от динамических условий среды.

В клетках нормального (неракового) происхождения, содержащих ген опухолевого супрессора p53 дикого типа, амплитуда положительной регуляции мРНК *ARF* и, соответственно, ARF-зависимой регуляции эффективности ЭРО и ОР-репарации в ответ на нерепарированные разрывы ДНК чрезвычайно невелика [Orlando G. *et al.*, 2014]. Это в значительной степени связано с существованием p53-зависимой отрицательной системы регуляции транскрипции *ARF*, которая необходима для ограничения накопления опухолевого супрессора p53 и регуляции выбора между лицензированием репликации ДНК и апоптозом [Robertson K.D. & Jones P.A., 1998]. Другим важным моментом является то, что ARF-зависимая регуляция активности MULE наблюдается только в случае длительного

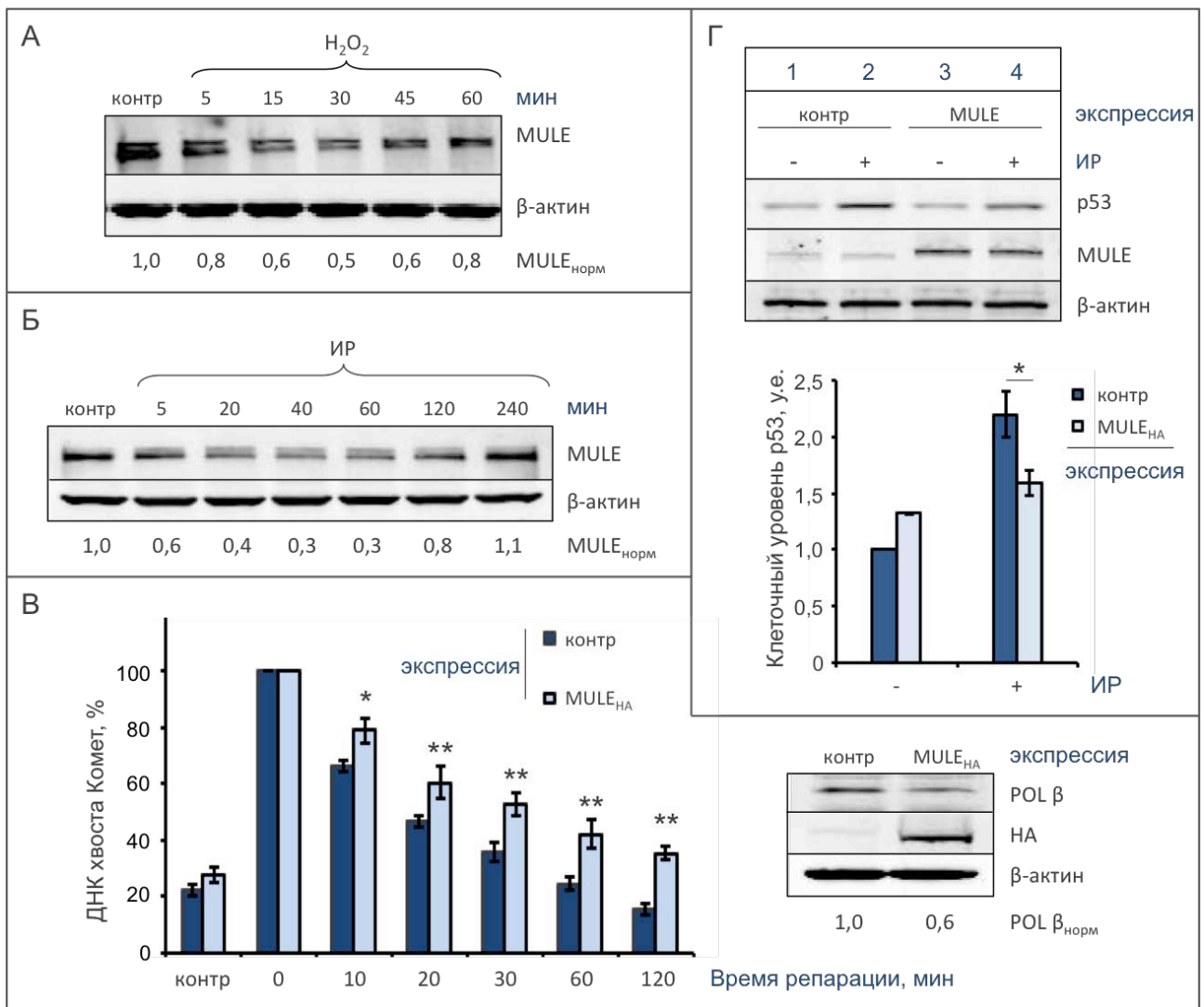
присутствия нерепарированных разрывов ДНК в клетках и не детектируется при кратковременном увеличении уровня повреждений ДНК в случае обработки клеток повреждающими ДНК агентами [Orlando G. *et al.*, 2014]. Это, несомненно, связано с высокой эффективностью систем репарации повреждений оснований и ОР. С другой стороны, вполне возможно, что ARF-зависимая система регуляции эффективности ЭРО и ОР-репарации является одной из последних линий клеточной защиты от раковой трансформации клеток. Наконец, в клетках, не содержащих функционального ARF, наблюдается стабилизация p53 в ответ на облучение ионизирующей радиацией и повышенный по сравнению со стационарным (то есть в отсутствие экзогенных повреждений) уровень репарации ДНК [Kamijo T. *et al.*, 1999].

Учитывая вышесказанное, в качестве рабочей гипотезы настоящего исследования рассматривали существование механизма, регулирующего эффективность систем ЭРО и репарации ОР (через стабильность POL  $\beta$ ) в зависимости от уровня нерепарированных повреждений ДНК и не зависящего от ARF или ARF-зависимой регуляции активности MULE. В дополнение к прямой регуляции содержания ферментов репарации ДНК в клетке, эффективность ЭРО и ОР-репарации может потенциально регулироваться через длительность фазы клеточного цикла G<sub>1</sub>. Одной из функций p53-зависимого ответа на ДР является пропорциональная уровню нерепарированных повреждений задержка клеточного цикла в фазе G<sub>1</sub> или, иными словами, задержка инициации репликации ДНК [Baker S.J. *et al.*, 1990; Mercer W.E. *et al.*, 1990; Michalovitz D. *et al.*, 1990]. В контексте ЭРО и репарации ОР подобная G<sub>1</sub>-задержка должна разрешать повышенное количество последовательных циклов репарации в фазе G<sub>1</sub> и, соответственно, увеличивать эффективность предрепликационной репарации ДНК. Учитывая то, что p53 является одним из основных субстратов MULE [Chen D. *et al.*, 2005], возникает вопрос не просто об ARF-независимой регуляции клеточного уровня POL  $\beta$ , а о существовании фундаментального механизма координации прогрессии клеточного цикла и модуляции эффективности ЭРО и ОР-репарации в зависимости от уровня повреждений ДНК и роли MULE в подобном механизме, а также о молекулярных каскадах, обеспечивающих передачу сигнала от ОР к системам их репарации, или, другими словами, системы клеточного ответа на нерепарированные ОР и ее роли в поддержании целостности генома, что является неотъемлемым свойством клетки нормального происхождения.

## РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ Е3-УБИКВИТИНЛИГАЗЫ MULE

Спектр субстратов Е3-убиквитинлигазы MULE, включающих POL  $\beta$  и p53, делает данный фермент идеальным кандидатом на роль эффектора клеточного ответа на нерепарированные ОР. Соответственно возник вопрос о существовании системы негативной регуляции белкового содержания MULE в ответ на ОР и механизма подобной регуляции.

**Негативная регуляция MULE в ответ на повреждения ДНК.** Для анализа клеточного уровня содержания MULE в ответ на повреждения ДНК проводили обработку человеческих клеток карциномы кишечника HCT116 p53<sup>+/+</sup> пероксидом водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и ионизирующей радиацией (ИР). Подобные повреждающие ДНК агенты вызывают образование значительного количества ОР, наряду с небольшой фракцией ДР и повреждений оснований ДНК. Было обнаружено значительное (40-50 %) и относительно быстрое (15-60 мин после обработки) снижение уровня экспрессии MULE (рис. 1А-Б). Подобный эффект не зависит от типа клеток, является кратковременным, поскольку наблюдается восстановление количества MULE до исходного в течение 1-2 ч после обработки, и соответствует временным рамкам полной репарации повреждений ДНК системами ЭРО и ОР-репарации (см. рис. 3.1-3.2 диссертации). Последнее указывает на возможную взаимосвязь регуляции содержания MULE и эффективности ЭРО и ОР-репарации. Действительно, при блокировании снижения клеточного уровня экспрессии MULE путем избыточной экспрессии фермента в ответ на повышение эффективного количества повреждений ДНК наблюдается, во-первых, снижение уровня POL  $\beta$  и соответствующее снижение эффективности репарации разрывов ДНК (рис. 1В), и, во-вторых, частичное, за счет существования компенсаторных механизмов, ограничение стабилизации p53 в ответ на облучение клеток человека ИР (рис. 1Г). Таким образом, клеточное содержание Е3-убиквитинлигазы MULE временно снижается в ответ на увеличение эффективного количества повреждений ДНК. Подобная регуляция важна для обеспечения повышенной стабильности субстратов данной Е3-убиквитинлигазы, за счет чего осуществляется модулируемое POL  $\beta$  повышение эффективности ЭРО и ОР-репарации, а также p53-зависимая сигнализация нерепарированных повреждений ДНК.



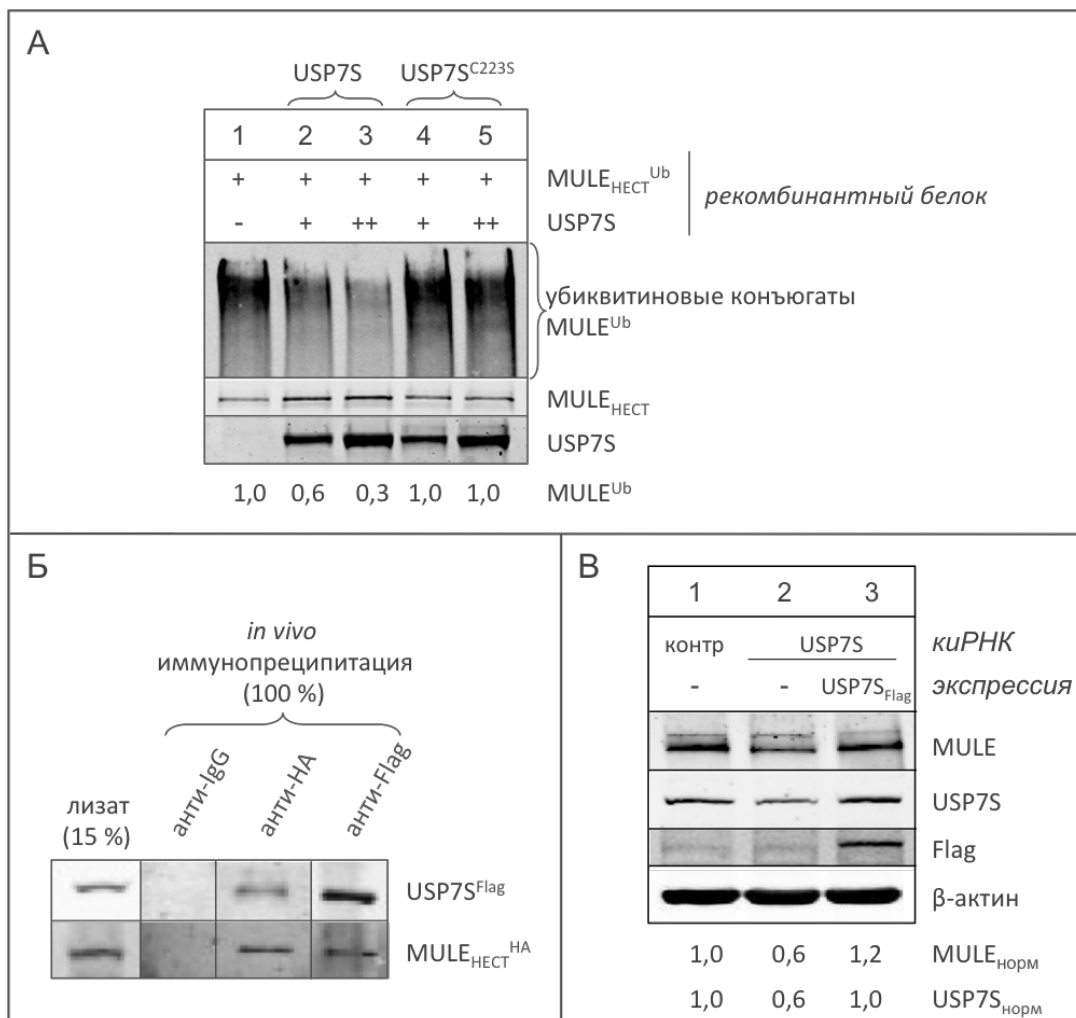
**Рис. 1.** Регуляция клеточного содержания MULE в зависимости от уровня повреждений ДНК и ее биохимическая значимость. **А-Б.** Клеточный уровень экспрессии MULE после обработки клеток 150 мкМ  $H_2O_2$  (15 мин) или 8 Гр ИР. **В-Г.** Клетки трансфицировали плазмидной ДНК, кодирующей ген *MULE* с HA-эпитопом (1 пмоль, 24 ч). **В.** Кинетику репарации ДНК исследовали методом ДНК-комет в условиях щелочного лизиса (25 мкМ  $H_2O_2$ , 5 мин). **Г.** Повреждения ДНК индуцировали 8 Гр ИР. Клетки НСТ116  $p53^{+/+}$ ; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по  $\beta$ -актину; \* $P < 0,001$  по данным 3-х независимых экспериментов.

Уровень экспрессии MULE в широком наборе раковых клеточных линий (с частотой до 15%), включающих клетки рака груди и легких [Adhikary S. *et al.*, 2005], шейки матки, желудка и желчного протока [Yoon S.Y. *et al.*, 2005], меланомы [Hodis E. *et al.*, 2012] и многих других типов раковых образований в соответствии с данными базы соматических мутаций COSMIC [Forbes S.A. *et al.*, 2011], значительно выше такового в клетках нормального происхождения. Более того, при использовании первичных клеток, полученных из раковых образований толстой кишки различных пациентов, было установлено, что содержание мРНК *MULE* напрямую коррелирует со стадией рака: в нормальных клетках было обнаружено лишь незначительное количество мРНК *MULE*, тогда как в аденомах и аденокарциномах

уровень экспрессии данного гена был приблизительно на 30 и 50 % выше, соответственно [Yoon S.Y. *et al.*, 2005]. При этом уровень экспрессии *MULE* был аннотирован как средний или повышенный в 40 % тканей рака толстой кишки (выборка из 70 пациентов) по сравнению с окружающими здоровыми тканями. В дополнение было показано, что снижение экспрессии *MULE* с использованием кнРНК репрессирует пролиферативную способность клеточных линий рака груди, содержащих мутации в гене *p53* [Chen, D. *et al.*, 2006], и множественных миелом с *p53* дикого типа [Crawford L. & Irvine A.E., 2016]. Эти литературные и полученные в настоящем исследовании экспериментальные данные указывают на то, что повышенная экспрессия *MULE* в ряде раковых клеток может быть одной из причин прогрессии онкогенеза. Это, по крайней мере частично, связано с тем, что в подобных случаях *p53*-зависимый ответ и эффективность ЭРО и ОР-репарации при характерном для раковых клеток высоком количестве повреждений ДНК ограничены за счет повышенного содержания *MULE*, что вносит свой вклад в высокую частоту образования и закрепления мутаций, а также сопряженный с ними злокачественный раковый процесс.

***USP7S-зависимая регуляция стационарного уровня содержания MULE.*** После выявления несомненной биохимической значимости эффекта кратковременной дестабилизации *MULE* в ответ на повреждения ДНК для координации их репарации возник вопрос о вышестоящих регуляторах подобного эффекта. На основании опубликованных ранее данных о феномене самоубиквитинирования *MULE* [de Bie P. & Ciechanover A., 2011]; также см. рис. 3.5 диссертации) и глобального протеомного анализа, указывающего на возможное существование взаимодействия *MULE* с убиквитин-специфическими протеазами [Sowa M.E. *et al.*, 2009], была предложена схема регуляции клеточного уровня экспрессии *MULE* балансом процессов самоубиквитинирования и противостоящего последнему деубиквитинирования специфической изоформой убиквитин-специфической протеазы USP7, USP7S. Было показано, что USP7S дикого типа, но не каталитически неактивная мутантная форма фермента с аминокислотной заменой C223S катализирует протеолиз убиквитиновых конъюгатов *MULE in vitro* (рис. 2A), что USP7S и *MULE* взаимодействуют *in vitro* и *in vivo* (рис. 2Б; также см. рис. 3.6 диссертации), и что USP7S ограничивает самоубиквитинирование *MULE in vivo*, предотвращая протеасомную деградацию данной E3-убиквитинлигазы (рис. 2B; также см. рис. 3.8B диссертации). Следует также отметить, что при избыточной экспрессии USP7S в клетках человека изменений содержания *MULE* не наблюдалось, что указывает на присутствие избытка активного USP7S,

поддерживающего стабильность MULE на относительно высоком уровне (см. рис. 3.9 диссертации). Последнее, в свою очередь, необходимо для поддержания сравнительно низкого стационарного уровня содержания POL  $\beta$  и p53 в неповрежденных клетках, который, тем не менее, достаточен для координации эффективной репарации эндогенных повреждений ДНК.



**Рис. 2.** Клеточное содержание MULE регулируется убиквитин-специфической протеазой USP7S. **А.** Протеолиз убиквитиновых конъюгатов MULE *in vitro* (0,6 пмоль) в присутствии USP7S дикого типа или каталитически неактивного USP7S<sup>C223S</sup> (0,6 и 1,2 пмоль). **Б.** Коиммунопреципитация белков *in vivo* после котрансфекции клеток плазмидами (1 пмоль, 24 ч), экспрессирующими MULE и USP7S с эпитопами HA и Flag, соответственно. Нанесены лизат (15%) и иммунопреципитат (100%); нормальные кроличьи IgG – контроль неспецифического связывания. **В.** Обработка клеток киРНК против USP7S (200 пмоль, 48 ч) с последующей трансфекцией плазмидной ДНК, кодирующей киРНК-устойчивый USP7S (USP7S<sub>Flag</sub>, 0,3 пмоль, дополнительные 24 ч). Клетки HeLa; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину.

Таким образом, была выявлена клеточная роль специфической изоформы USP7S убиквитин-специфической протеазы USP7 в регуляции стабильности MULE. Принимая во внимание то, что в ответ на генотоксический стресс наблюдается описанное выше снижение



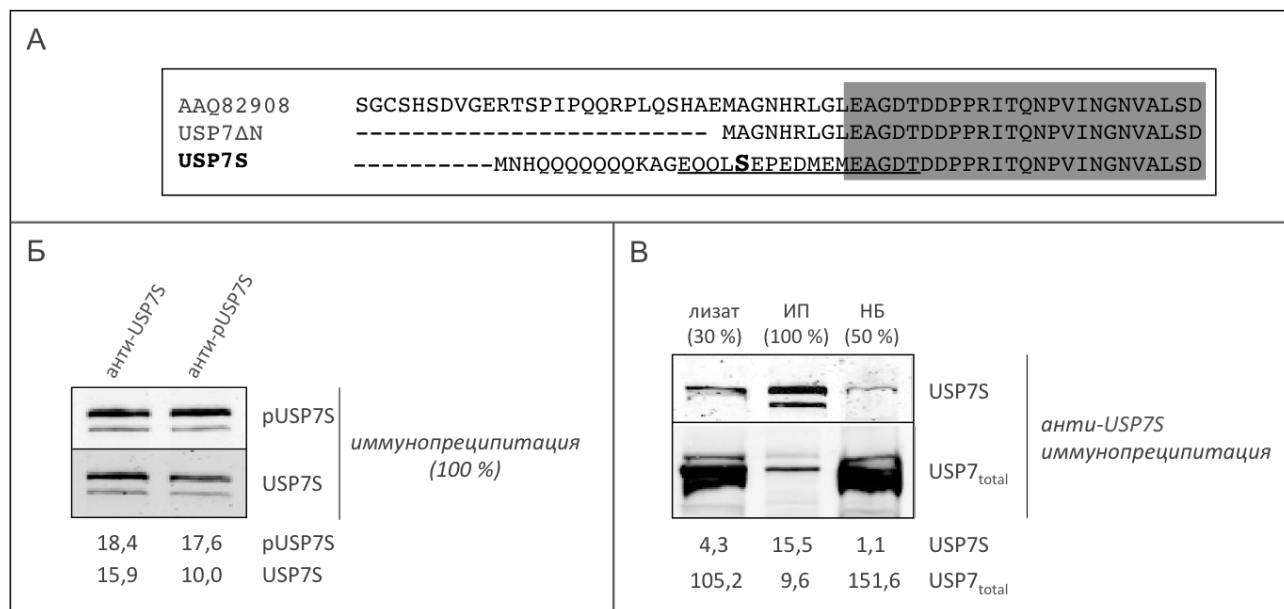
клеточного содержания MULE, причем повышения активности фермента в таком случае не наблюдается [Orlando G. *et al.*, 2014], было высказано предположение, что клеточное содержание и/или активность USP7S, и/или, возможно, комплексообразование USP7S и MULE регулируются в соответствии с уровнем повреждений ДНК. Поэтому на следующем этапе работы было проведено систематическое исследование регуляции клеточного уровня экспрессии USP7S в эндогенных условиях, а также в ответ на генотоксический стресс.

## РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ USP7S

**Клеточное содержание, статус фосфорилирования и функция специфической изоформы USP7S.** Для выяснения молекулярных деталей клеточной регуляции USP7S требовалось прежде всего понимание роли данной изоформы среди общего пула фермента. В настоящий момент идентифицировано несколько изоформ USP7 с различающимися N-концевыми последовательностями белка (рис. 3А). При проведении аминокислотного выравнивания последовательностей различных изоформ USP7 было показано, что USP7S является единственной изоформой белка, содержащей высококонсервативный среди ферментов из высших животных остаток серина 18 (см. рис. 3.10Б диссертации), который является сайтом фосфорилирования по данным глобального протеомного анализа фосфорилированных белков [Beausoleil S.A. *et al.*, 2004]. Для исследования роли S18-фосфорилирования USP7S были получены кроличьи поликлональные антитела с использованием фосфорилированного и нефосфорилированного по S18 пептидов USP7S, включающих аминокислотные остатки 14-30, в качестве антигенов (рис. 3А, последовательность пептида выделена красным цветом и подчеркиванием). Была показана специфичность антител к фосфорилированной и нефосфорилированной по S18 формам USP7S (см. рис. 3.15В диссертации) и гибридизация обоих антител с содержащимся в цельных клеточных экстрактах USP7S, что указывает на существование фосфорилированной формы белка в клетках человека (см. рис. 3.10В диссертации).

Оценку относительного количества фосфорилированной формы USP7S в эндогенных условиях проводили путем иммунопреципитации белка из цельных клеточных экстрактов HeLa с использованием антител к фосфорилированной по остатку S18 (pUSP7S) и нефосфорилированной (USP7S) форме фермента, причем уровень эффективности иммунопреципитации обоими антителами был одинаков (см. нижнюю панель рис. 3.10Г диссертации). При использовании pUSP7S и USP7S антител наблюдалась

иммунопреципитация равных количеств фосфорилированного фермента (рис. 3Б, верхняя панель), тогда как при использовании рUSP7S антител удалось осадить 60-80 % от общего количества (модифицированного фосфорилированием и нет) белка (рис. 3Б, нижняя панель). Полученные данные указывают на эндогенный уровень фосфорилирования USP7S по остатку S18, составляющий порядка 60-80 % в клетках HeLa.

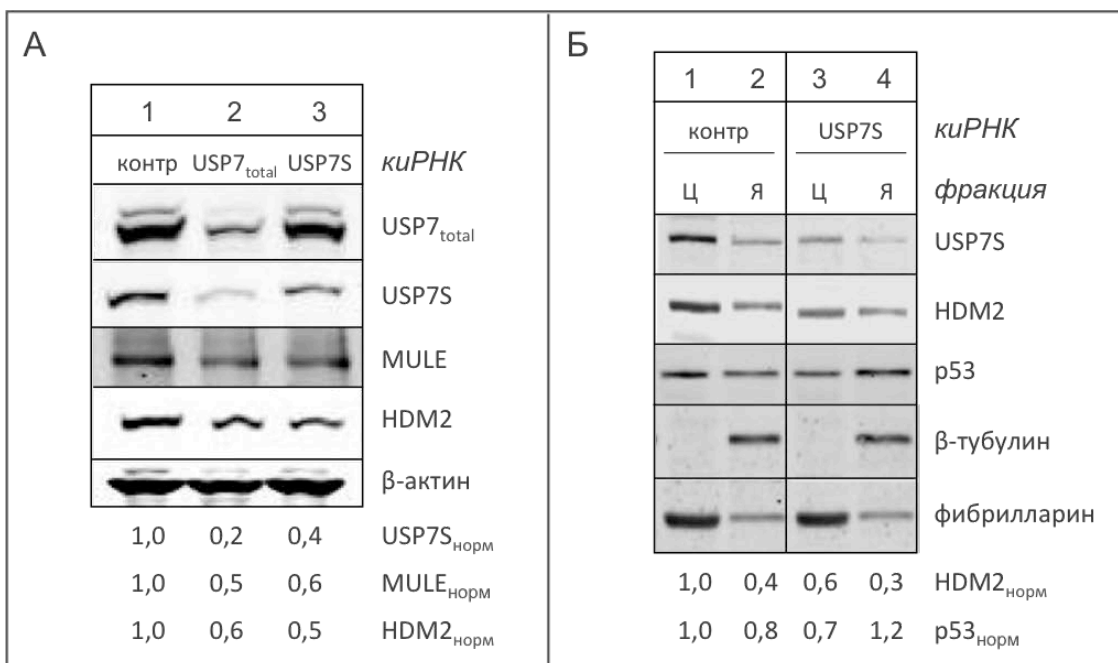


**Рис. 3.** Статус фосфорилирования по остатку S18 и клеточное содержание изоформы USP7S. **А.** Выравнивание N-концевых аминокислотных последовательностей изоформ USP7S: AAQ82908.1, NP\_001273386.1 (USP7ΔN) и NP\_003461.2 (USP7S). Из-за значительно более коротких N-концевых последовательностей изоформы NP\_001273387.1 и NP\_001308787.1 не показаны. **Б-В.** Оценка уровня **(Б)** S18-фосфорилирования USP7S и **(В)** клеточного содержания USP7S среди других изоформ фермента иммунопреципитацией из цельных клеточных экстрактов HeLa с использованием антител против **(Б)** pUSP7S и USP7S и **(В)** USP7S. **В.** Нанесены лизат (30 %), иммунопреципитат (ИП, 100 %) и фракция несвязавшихся белков (НБ, 50 %); антитела USP7<sub>total</sub> распознают все изоформы USP7.

Для ответа на вопрос, является ли USP7S основной изоформой убиквитин-специфической протеазы USP7, была проведена высокоэффективная иммунопреципитация (90-95 %) белка из цельного клеточного экстракта с использованием антител против USP7S (рис. 3В, верхняя панель). Для определения процентного содержания USP7S среди других изоформ фермента была проведена гибридизация USP7S-преципитата с коммерчески доступными антителами, распознающими все известные изоформы белка за счет их генерации против С-концевого эпитопа USP7 в качестве антигена (USP7<sub>total</sub>). Полностью осажденная из цельного клеточного экстракта изоформа USP7S составила лишь небольшую часть (порядка 3-5 %) от общего количества белка (рис. 3В, нижняя панель).

В настоящем исследовании, как и в случае большинства приведенных в научной литературе работ, для трансфекции клеток животных использовали плазмидную ДНК, кодирующую специфическую изоформу *USP7S* гена *USP7*. Именно *USP7S* была изначально описана в литературе как обладающая деубиквитинилирующей активностью протеаза *USP7*, субстратом которой является E3-убиквитинлигаза *HDM2*, - один из основных регуляторов клеточного уровня экспрессии p53 [Li M. *et al.*, 2004; Meulmeester E. *et al.*, 2005]. Учитывая выявленное в настоящем исследовании невысокое содержание *USP7S* среди других изоформ *USP7* (рис. 3B), возник вопрос об относительном вкладе различных изоформ фермента в регуляцию его субстратов. Для ответа на данный вопрос экспрессию убиквитин-специфической протеазы подавляли либо с использованием кнРНК против всех транскрипционных вариантов *USP7* (*USP7<sub>total</sub>*), либо против *USP7S*. Общий нокадаун гена фермента с использованием *USP7<sub>total</sub>*-кнРНК привел к снижению содержания всех его изоформ, включая *USP7S*, и соответствующей пониженной стабильности обоих *MULE* и *HDM2* за счет их самоубиквитинилирования в отсутствие деубиквитинилирующего фермента (рис. 4A, дорожки 1-2). При этом снижение клеточного уровня *MULE* и *HDM2* в случае нокадауна лишь изоформы *USP7S*, эффективность которого относительно невысока из-за близости комплементарной кнРНК последовательности к 5'-концевому участку мРНК *USP7S*, аналогично таковому в случае нокадауна всех изоформ фермента (рис. 4A, дорожка 3 по сравнению с дорожкой 2). Более того, снижение уровня экспрессии *HDM2* после нокадауна *USP7S* сопровождалось характерной релокализацией p53 в ядро (рис. 4Б; [Wu X. *et al.*, 1993]).

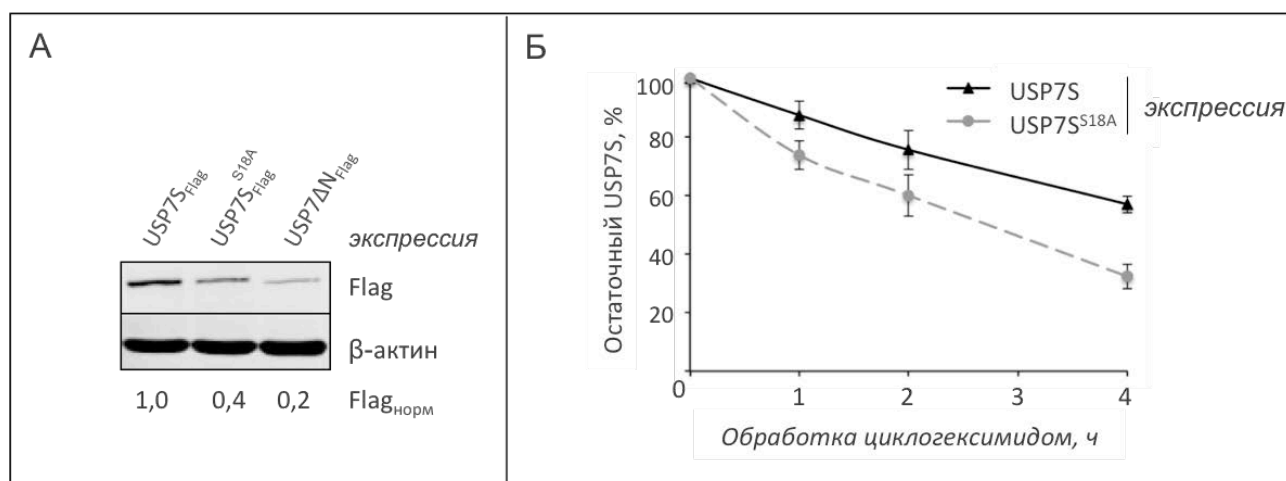
Полученные данные свидетельствуют о том, что специфическая изоформа *USP7S*, содержание которой среди общего пула фермента невысоко (3-5 %), является основным регулятором стабильности E3-убиквитинлигаз *MULE* и *HDM2* и опосредованно *POL β* и p53. С учетом результатов настоящего исследования возникает вопрос о клеточной роли других изоформ *USP7*, которые, вероятно, вовлечены в регуляцию независимых путей клеточного ответа на генотоксический стресс, выяснение чего требует дополнительных исследований. Учитывая важность биохимической функции *USP7S* и высокий эндогенный уровень фосфорилирования остатка S18 фермента (60-80 %), последующие эксперименты были посвящены исследованию механизма регуляции клеточного уровня содержания и активности данной изоформы, а также взаимосвязи последних со статусом фосфорилирования *USP7S* по аминокислотному остатку серина 18.



**Рис. 4.** Роль USP7S в регуляции стабильности MULE, HDM2 и p53. **А.** Нокадаун всех транскрипционных вариантов *USP7* (*USP7<sub>total</sub>*) или *USP7S* (200 пмоль киРНК, 60 ч). **Б.** Фракционирование клеточного содержимого на цитоплазматическую (Ц) и ядерную (Я) фракции после нокадауна *USP7S* (60 ч). Клетки **(А)** HeLa и **(Б)** HCT116 p53<sup>+/+</sup>; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по **(А)** β-актину или **(Б)** β-тубулину и фибрилларину.

**Фосфорилирование USP7S по остатку S18 регулирует стабильность и активность фермента.** Для исследования роли фосфорилирования по остатку S18 в функции USP7S в первую очередь была проведена оценка стабильности фосфорилированной и мутантной форм фермента с заменой остатка серина 18 на аланин, а также изоформы USP7ΔN с N-концевой делецией, которая не содержит S18 (см. рис. 3А). Было показано, что результатом трансфекции клеток человека эквимольными количествами плазмидной ДНК, кодирующей гены *USP7S* дикого типа и мутантных *USP7S<sup>S18A</sup>* и *USP7ΔN*, является пониженный стационарный уровень экспрессии нефосфорилированных по остатку S18 белков *USP7S<sup>S18A</sup>* и *USP7ΔN* по сравнению с таковым в случае *USP7S* дикого типа (рис. 5А). Более того, при обработке клеток ингибитором рибосомального синтеза белков циклогексимидом, было показано, что среднее время полужизни *USP7S<sup>S18A</sup>* равно 2,8 ч по сравнению со средним временем полужизни фермента дикого типа, составляющим более 4 ч (рис. 5Б). Полученные экспериментальные данные указывают на то, что мутантный фермент *USP7S* с заменой S18А, который не подвергается внутриклеточному фосфорилированию по остатку S18, и изоформа *USP7ΔN*, которая остатка S18 не содержит, обладают пониженной стабильностью по сравнению с ферментом дикого типа, 60-80 % которого фосфорилировано по S18 в эндогенных условиях. В связи с этим клеточная функция *USP7S<sup>S18A</sup>* и *USP7ΔN* по

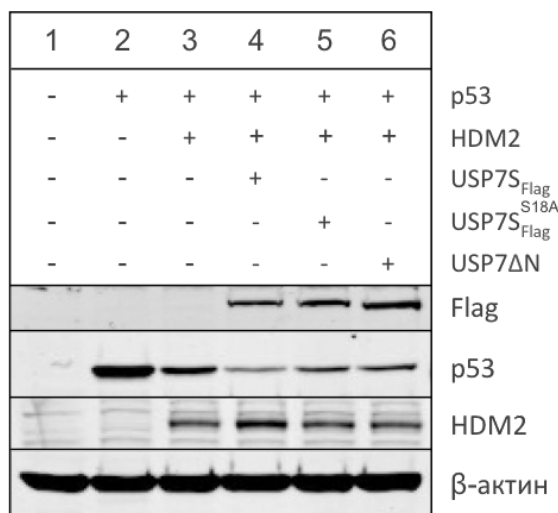
поддержанию стабильности субстратов, в частности, HDM2 является неполной по сравнению с фосфорилированной по остатку S18 формой фермента (см. рис. 3.14А диссертации).



**Рис. 5.** Роль фосфорилирования остатка S18 в регуляции стабильности USP7S. Трансфекция клеток **(А)** эквимоллярными количествами плазмидной ДНК, кодирующей *USP7S*, *USP7S<sup>S18A</sup>* или *USP7ΔN* (0,3 пмоль, 24 ч) или **(Б)** экспрессионными векторами, кодирующими *USP7S* (0,2 пмоль) или *USP7S<sup>S18A</sup>* (0,6 пмоль), в течение 24 ч с последующей обработкой циклогексимином (50 мкг/мл). **Б.** Были достигнуты равные клеточные уровни содержания USP7S и USP7S<sup>S18A</sup>. Клетки HeLa; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину; стандартное отклонение по данным 3-х экспериментов.

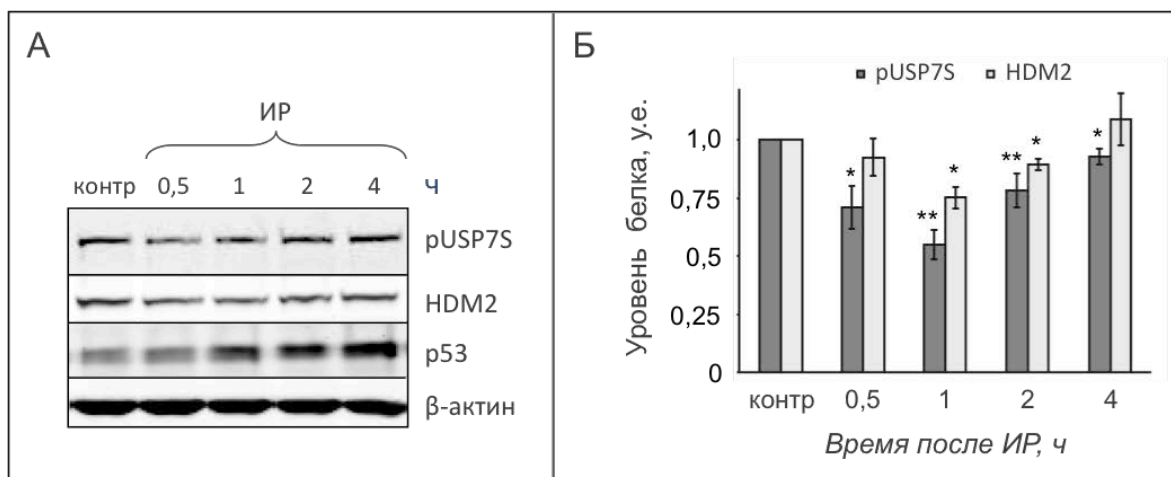
Для оценки влияния фосфорилирования аминокислотного остатка S18 в USP7S на активность фермента проводили одновременную избыточную экспрессию USP7S дикого типа, USP7S<sup>S18A</sup> или изоформы USP7ΔN (для достижения равного содержания форм фермента использовали большее количество экспрессионного вектора, кодирующего USP7S<sup>S18A</sup> и USP7ΔN, по сравнению с таковым для USP7S дикого типа), HDM2 и p53 в клетках человека. Уровень экспрессии p53 относительно высок, причем наблюдается его снижение при коэкспрессии p53 с его основной E3-убиквитинлигазой HDM2 (рис. 6, дорожка 3 по сравнению с дорожкой 2). При избыточной экспрессии p53, HDM2 и USP7S наблюдается еще более эффективная дестабилизация p53, обусловленная повышенной стабильностью HDM2 в присутствии дополнительного количества деубиквитилирующего фермента (рис. 6, дорожка 4). Способность мутантного USP7S<sup>S18A</sup> и изоформы USP7ΔN к поддержанию стабильности HDM2 и соответствующей опосредованной дестабилизации p53 значительно ниже таковой в случае USP7S дикого типа (рис. 6, дорожки 5, 6 по сравнению с дорожкой 4). Полученные данные свидетельствуют о важности фосфорилирования S18 в USP7S в поддержании ферментативной активности фермента по отношению к HDM2 и логически других субстратов фермента, например, MULE. Несмотря на то, что напрямую (например, с использованием котрансфекции экспрессирующих MULE и различные формы USP7S

плазмидных ДНК *in vivo* при нормализации содержания убиквитин-специфической протеазы) данное утверждение не проверялось, USP7S-зависимая регуляция MULE, по сути включающая зависящий от комбинации активности и стабильности убиквитин-специфической протеазы контроль, была экспериментально показана выше (см. рис. 2 и 4).



**Рис. 6.** Роль фосфорилирования остатка S18 в регуляции активности USP7S. Одновременная трансфекция клеток плазмидными ДНК, кодирующими USP7S (0,2 пмоль), USP7S<sup>S18A</sup> (0,6 пмоль) или USP7ΔN (0,8 пмоль), HDM2 (0,7 пмоль) и p53 (0,45 пмоль) в течение 24 ч. Клетки U-2 OS; контроль равного нанесения образцов при гибридизации с антителами против β-актина.

**Дефосфорилирование USP7S в ответ на повреждения ДНК.** Учитывая роль фосфорилирования USP7S по остатку S18 в поддержании стабильности фермента, было высказано предположение, что причиной дестабилизации MULE в ответ на повреждения ДНК может являться вызванная изменением статуса фосфорилирования пониженная стабильность USP7S. При обработке клеток нормальных первичных фибробластов человека ИП было обнаружено статистически достоверное кратковременное снижение уровня фосфорилирования USP7S по остатку S18 во временных рамках, аналогичных таковым в случае MULE (см. рис. 2). В полном соответствии с USP7S-зависимой дестабилизацией MULE в ответ на повреждения ДНК, снижение уровня экспрессии рUSP7S после ИП сопровождалось дестабилизацией HDM2 и соответствующим накоплением p53 (рис. 7). Отметим, что аналогичные результаты наблюдали и в клетках НСТ116 p53<sup>+/+</sup>, что исключает специфичность эффекта в зависимости от типа клеток (см. рис. 3.20В диссертации). Полученные данные указывают на возможную взаимосвязь между снижением уровня фосфорилирования (стабильности) USP7S в ответ на повреждения ДНК и дестабилизации субстратов данного белка, E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2, обеспечиваемой их самоубиквитинилированием.



**Рис. 7.** Кинетика изменения содержания pUSP7S в ответ на повреждения ДНК. Клетки человека подвергали обработке 10 Гр ИР и анализировали в течение указанных интервалов времени после обработки. Клетки TIG-1; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину; \* $P < 0,01$ , \*\* $P < 0,001$  по данным 3-х независимых экспериментов.

Отметим, что подобный эффект дестабилизации USP7S наблюдался в более поздних работах в ответ на облучение ИР [Cui H. *et al.*, 2015; Papp S.J. *et al.*, 2015] и отсутствовал при обработке клеток УФ-радиацией, доксорубицином и этопозидом [Papp S.J. *et al.*, 2015; Park J.J. *et al.*, 2015; Reddy V.A. *et al.*, 2014], что указывает на возможную специфичность данного явления в зависимости от типа повреждений ДНК.

**Казеин-киназа 2 фосфорилирует остаток S18 в USP7S.** Для выяснения механизма регуляции уровня фосфорилирования остатка S18 в USP7S в ответ на повреждения ДНК требовалось выявить протеинкиназу, ответственную за данную посттрансляционную модификацию, и установить, регулируется ли активность и/или уровень экспрессии данной киназы и/или ее комплексообразование с USP7S в зависимости от уровня повреждений ДНК. Для выделения киназной активности, обеспечивающей фосфорилирование USP7S по остатку S18, было решено использовать объективный биохимический подход [Parsons J.L. *et al.*, 2009].

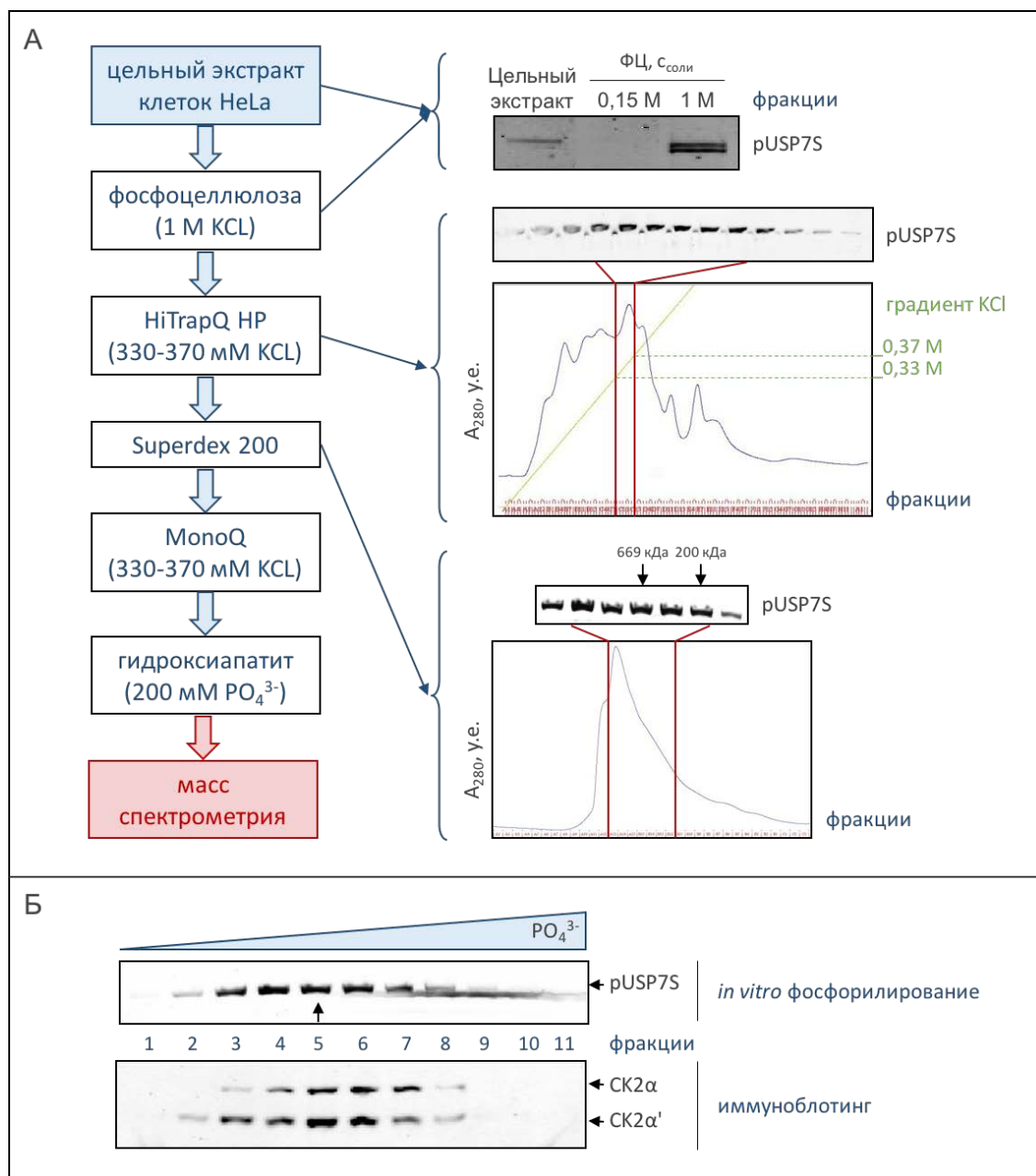
Суть данного подхода применительно к случаю идентификации USP7S-фосфорилирующей активности заключалась в проведении последовательного фракционирования цельного клеточного экстракта через ряд хроматографических колонок (рис. 8А). Активность полученных после хроматографии фракций анализировали в реакциях фосфорилирования *in vitro* с использованием дефосфорилированного рекомбинантного USP7S в качестве субстрата (USP7S<sup>дефос</sup>) для повышения чувствительности анализа. Рекомбинантный USP7S с His-эпитопом получали с использованием бакуловирус-инфицированных клеток насекомых *Spodoptera frugiperda* (Sf9) в качестве продуцентов.

Субстрат USP7S<sup>дефос</sup> получали дефосфорилированием очищенного рекомбинантного USP7S с последующей дополнительной очисткой на Ni<sup>2+</sup>-сефарозе (см. рис. 3.15 диссертации). Фракции, демонстрирующие S18-киназную активность в реакциях фосфорилирования USP7S<sup>дефос</sup> *in vitro*, объединяли и подвергали дальнейшему фракционированию (рис. 8А). Высокоактивные фракции после заключительной стадии 5-тиступенчатого фракционирования цельного клеточного экстракта HeLa на гидроксипатите были проанализированы методом tandemной масс-спектрометрии (рис. 8Б, верхняя панель). Единственной протеинкиназой, обнаруженной в полученных фракциях, является казеин-киназа 2 (СК2), причем в анализируемых фракциях наблюдали детекцию ряда пептидов каталитических СК2 $\alpha$  и СК2 $\alpha'$  и регуляторной СК2 $\beta$  субъединиц СК2 (см. табл. 3.1 диссертации). При иммуноблоттинге полученных фракций с антителами к СК2 было обнаружено соответствие пика активности, фосфорилирующей USP7S по остатку S18, пику детекции каталитических субъединиц данной киназы (рис. 8Б, нижняя панель). Учитывая результаты анализа фракций после хроматографического разделения экстракта HeLa, а также того, что консенсусная последовательность протеинкиназы СК2 включает S18-содержащий пептид USP7S (см. рис. 3.10Б диссертации), было высказано предположение, что СК2 может выполнять роль протеинкиназы, фосфорилирующей USP7S по остатку S18.

При проведении реакций *in vitro* с использованием дефосфорилированных USP7S дикого типа и мутантного USP7S<sup>S18A</sup> в качестве субстратов в присутствии очищенной рекомбинантной СК2 и АТФ, меченного радиоактивным изотопом фосфора <sup>32</sup>P, наблюдалось эффективное фосфорилирование USP7S, но не мутантной формы фермента USP7S<sup>S18A</sup> (рис. 9А). Полученные результаты свидетельствуют о том, что СК2 может напрямую фосфорилировать остаток S18 в USP7S, причем данный сайт фосфорилирования является основным. Было установлено, что кРНК-нокдаун экспрессии обеих каталитических субъединиц СК2 приводит к пониженному уровню S18-фосфорилирования USP7S, а также снижению клеточного содержания обоих USP7S и его субстрата HDM2 (рис. 9Б), указывая на значимую клеточную роль СК2-зависимого фосфорилирования USP7S по остатку S18 в обеспечении стабильности и активности фермента. Отметим, что СК2-зависимое фосфорилирование в ряде случаев необходимо для поддержания стабильности субстратов, например, XRCC1 и PTEN путем предотвращения их полиубиквитинилирования и последующей протеасомной деградации [Parsons J.L. *et al.*, 2010; Torres J. *et al.*, 2003]. Аналогичная ситуация наблюдается и в случае USP7S, поскольку эффективность



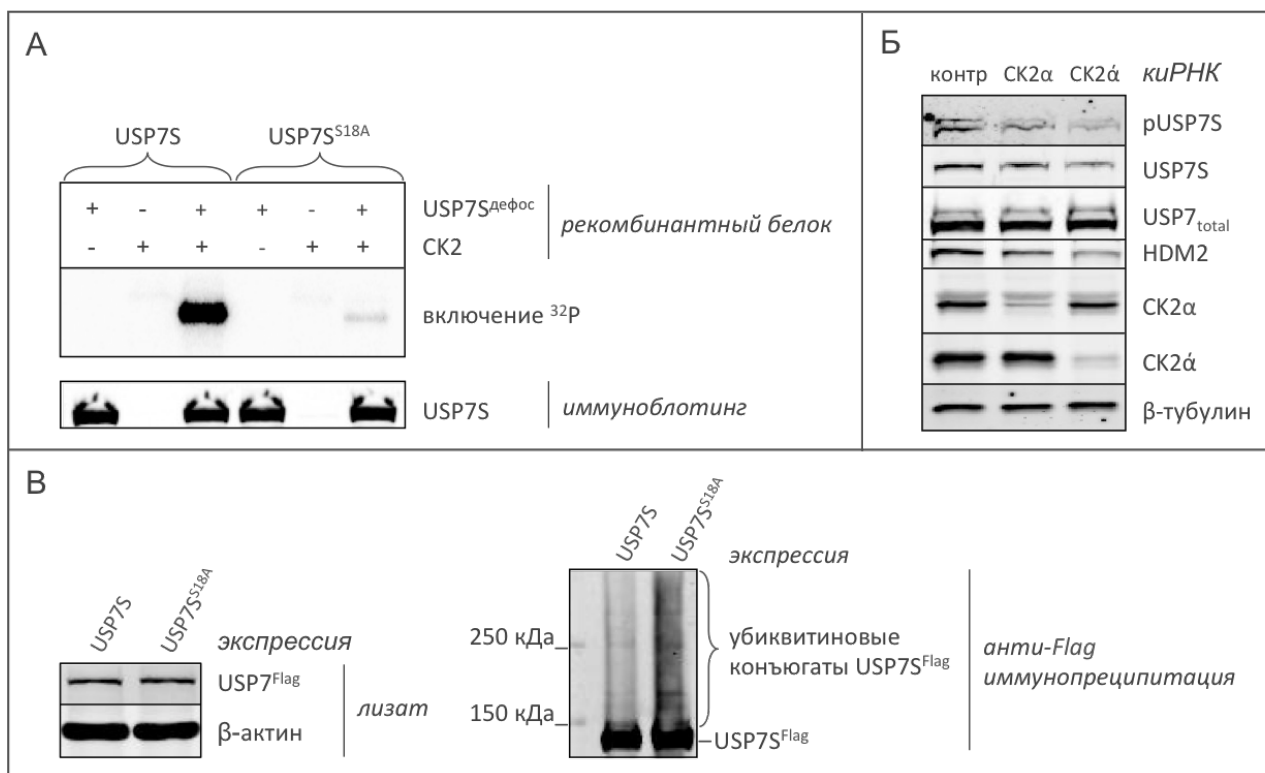
полиубиквитинирования мутантной формы USP7S<sup>S18A</sup> *in vivo* значительно выше такового в случае S18-фосфорилированного фермента и отражает пониженную стабильность нефосфорилированного белка (рис. 9B).



**Рис. 8.** Биохимическая идентификация киназы, фосфорилирующей остаток S18 в USP7S. **А.** Схема хроматографического разделения клеточного экстракта HeLa с анализом активности фракций в реакциях фосфорилирования *in vitro* (1 пмоль USP7S<sup>дефос</sup> в качестве субстрата, 2-5 мкл фракций, 60 мин, 30 °С). **Б.** Фосфорилирование USP7S<sup>дефос</sup> *in vitro* хроматографическими фракциями после разделения на колонке с гидроксиапатитом. Стрелкой обозначена фракция 5, масс-спектрометрический анализ которой выявил присутствие единственной протеинкиназы CK2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что CK2-зависимое фосфорилирование USP7S по остатку S18 играет важнейшую роль в HDM2- и MULE-зависимой регуляции клеточного содержания p53, а также стационарной

эффективности ЭРО и ОР-репарации через контроль уровня содержания POL  $\beta$ . В соответствии с антиапоптотической ролью CK2 в USP7S-зависимой регуляции p53 и POL  $\beta$  можно предположить, что повышенная экспрессия и/или активация данной протеинкиназы может вносить частичный вклад (лишь частичный, поскольку роль CK2 в защите клеток от апоптоза путем регуляции активности ряда опухолевых супрессоров и онкогенов чрезвычайно обширна) в генетическую нестабильность клеток и их последующую неопластическую трансформацию. Действительно, повышенная активность CK2 ассоциирована с онкотрансформацией различных типов тканей и коррелирует с агрессивным поведением опухолей, а повышенная экспрессия CK2 наблюдается в раке почек, молочной железы, легких, простаты и опухолях головы и шеи [Duncan J.S. & Litchfield D.W., 2008].



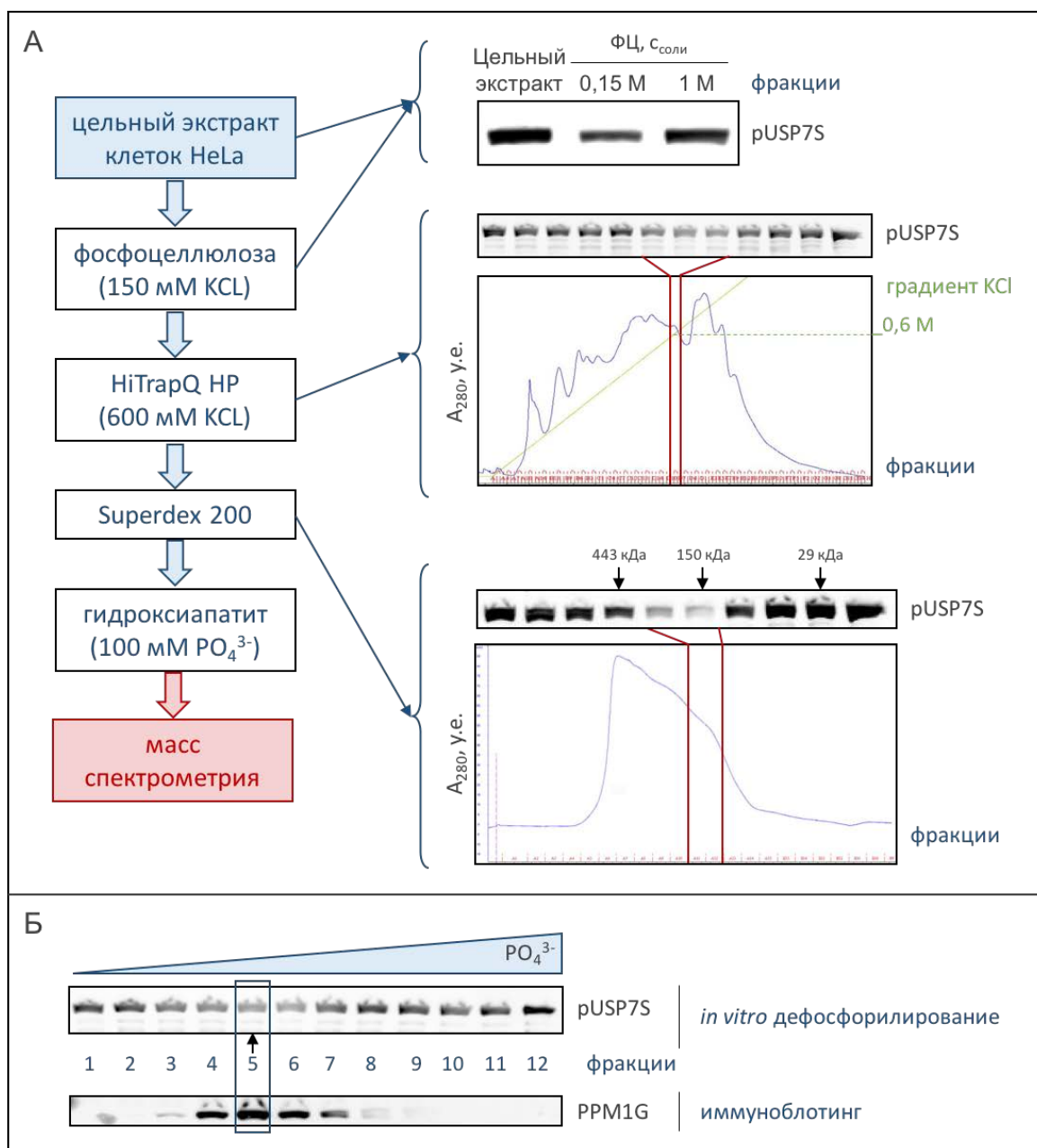
**Рис. 9.** CK2 фосфорилирует остаток S18 в USP7S, предотвращая протеасомную деградацию фермента. **А.** Авторадиограф фосфорилирования дефосфорилированных USP7S или мутантного USP7S<sup>S18A</sup> *in vitro* (2,8 пмоль) в присутствии очищенной рекомбинантной CK2 (2 пмоль) и [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ (30 мин, 30 °C). **Б.** Нокдаун CK2 $\alpha$  и CK2 $\alpha$  с использованием киPHK (200 пмоль, 60 ч). **В.** Трансфекция клеток человека плазмидными ДНК, кодирующими USP7S (0,2 пмоль) или USP7S<sup>S18A</sup> (0,6 пмоль), в течение 24 ч с последующей анти-Flag иммунопреципитацией и гибридизацией с антителами к убиквитиновым конъюгатам. Клетки HeLa; контр – контроль.

Несмотря на то, что субстратами CK2 является ряд белков, участвующих в ответе клеток на повреждения ДНК, и их фосфорилирование данной киназой часто обеспечивает повышение эффективности репарации ДНК, эффективность CK2-зависимого

фосфорилирования в ответ на генотоксический стресс в большинстве случаев контролируется индивидуально через локализацию на сайтах повреждений ДНК (в частности, ДР), регуляторные взаимодействия с ингибиторами и активаторами фермента, экспрессию гена или комплексообразование с субстратом [Duan Y. *et al.*, 2014; Herhaus L. *et al.*, 2015]. Более того, текущий консенсус заключается в том, что базовая каталитическая активность данной киназы не изменяется в ответ на различные типы стресса, под действием специфических лигандов или при изменении метаболизма [Montenarh M., 2010]. Соответственно, было высказано предположение, что дестабилизация USP7S через дефосфорилирование фермента в ответ на генотоксический стресс обеспечивается путем положительной модуляцией активности и/или клеточного уровня содержания, и/или комплексообразования с USP7S протеинфосфатазы, ответственной за модификацию остатка S18 в USP7S, в зависимости от уровня повреждений ДНК.

**Дефосфорилирование остатка S18 в USP7S фосфатазой PPM1G.** Для биохимического выделения фосфатазной активности, дефосфорилирующей остаток S18 в USP7S, использовали описанный выше принцип последовательного фракционирования цельного клеточного экстракта HeLa через ряд хроматографических колонок (рис. 10А). Для идентификации фракций с искомой фосфатазной активностью использовали реакции дефосфорилирования *in vitro*, в которых роль субстрата играл рекомбинантный USP7S, очищенный из клеток Sf9 и в значительной мере фосфорилированный по S18 (порядка 60 %; см. рис. 3.15 диссертации).

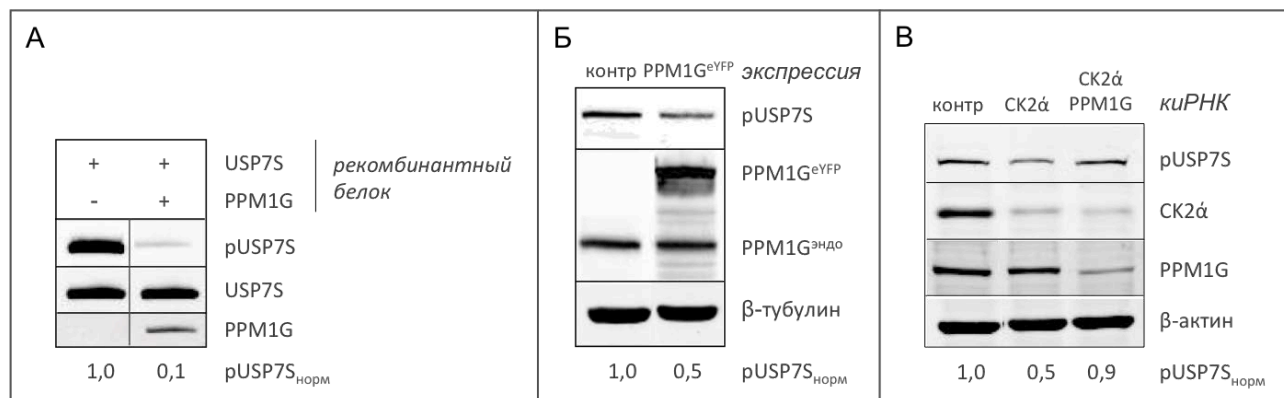
Проявляющая наиболее высокую USP7S-фосфатазную активность фракция 5, полученная на заключительной стадии хроматографического разделения цельного клеточного экстракта на гидроксипатите, была проанализирована методом тандемной масс-спектрометрии (рис. 10Б, верхняя панель). Единственным кандидатом на дефосфорилирование USP7S, обнаруженным в данной фракции, оказалась серин/треонин-специфичная протеинфосфатаза PPM1G, также часто называемая PP2C $\gamma$  (см. табл. 3.2 диссертации). Подтверждая данные масс-спектрометрии, PPM1G была обнаружена в хроматографических фракциях, демонстрирующих USP7S-фосфатазную активность, методом иммуноблотинга (рис. 10Б, нижняя панель).



**Рис. 10.** Биохимическая идентификация фосфатазы, дефосфорилирующей остаток S18 в USP7S. **А.** Схема хроматографического разделения клеточного экстракта HeLa с анализом активности фракций в реакциях дефосфорилирования *in vitro* (1 пмоль USP7S в качестве субстрата, 5 мкл фракций, 60 мин, 30 °С). **Б.** Дефосфорилирование USP7S *in vitro* хроматографическими фракциями после разделения на колонке с гидроксиапатитом. Фракцию 5 (обозначена стрелкой) анализировали методом тандемной масс-спектрометрии на присутствие фосфатаз.

Для исследования физиологических последствий потери функциональной активности PPM1G в клетках человека был проведен нокаун экспрессии *PPM1G* с применением киРНК. Результатом эксперимента было относительно небольшое, но статистически значимое увеличение количества фосфорилированного USP7S, что хорошо согласуется с данными о высоком уровне фосфорилирования фермента в эндогенных условиях (см. рис. 3Б), а также снижение клеточного уровня экспрессии p53 (рис. 12А). Для выявления зависимости статуса

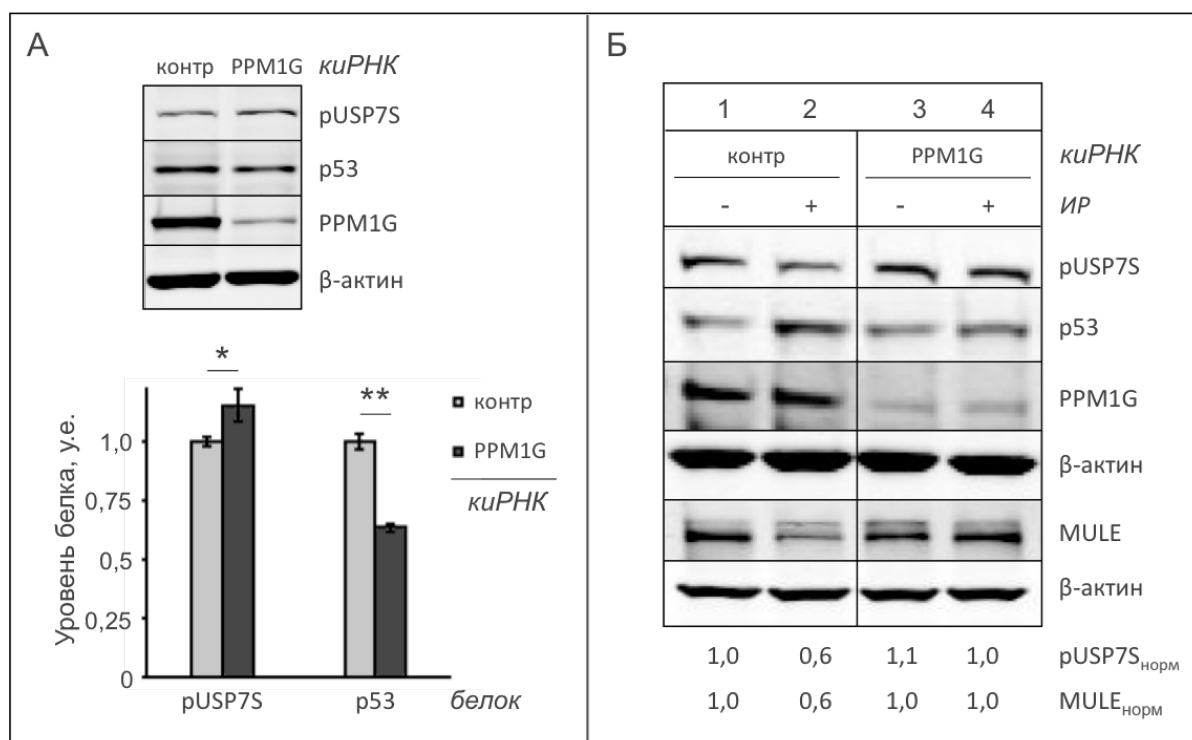
фосфорилирования USP7S и стабильности его субстратов в ответ на повреждения ДНК от присутствия фосфатазы проводили киРНК-нокаун экспрессии *PPM1G* в клетках нормальных первичных фибробластов человека с последующей обработкой ИР. В соответствии с полученными ранее данными содержание pUSP7S и MULE снижалось в ответ на индукцию повреждений ДНК (см. рис. 1 и 7), тогда как в отсутствие *PPM1G* подобного явления не наблюдалось (рис. 12Б, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2). Более того, ИР-зависимая стабилизация p53 блокирована в *PPM1G*-дефицитных клетках (рис. 12Б, дорожка 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что фосфатаза *PPM1G* регулирует дефосфорилирование USP7S, и, как следствие, стабильность MULE и важных в контексте данной работы субстратов этой E3-убиквитинлигазы, включающих p53 и POL  $\beta$ , в зависимости от уровня повреждений ДНК.



**Рис. 11.** *PPM1G* дефосфорилирует остаток S18 в USP7S. **А.** Дефосфорилирование USP7S *in vitro* в присутствии рекомбинантной *PPM1G* (2,8 пмоль каждого, 30 мин, 30°C). **Б.** Дефосфорилирование USP7S *in vivo* при трансфекции клеток плазмидной ДНК, кодирующей *PPM1G* с eYFP-эпитопом (1 пмоль, 24 ч). **В.** Трансфекция клеток киРНК против *CK2α* или одновременно *CK2α* и *PPM1G* (200 пмоль, 60 ч). Клетки **(Б)** HeLa и **(В)** НСТ116 p53<sup>+/+</sup>; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину или β-тубулину.

Отметим, что, несмотря на наблюдаемое снижение уровня фосфорилированного USP7S после обработки клеток ИР, уровень экспрессии *PPM1G* в ответ на повреждения ДНК не увеличивается (рис. 12Б, дорожки 1, 2; также см. рис. 3.27 диссертации). Подобное наблюдение свидетельствует о том, что более эффективное дефосфорилирование USP7S в ответ на повреждения ДНК обеспечивается либо повышенной активностью *PPM1G*, либо более эффективным образованием белкового комплекса между *PPM1G* и USP7S. По результатам коиммунопреципитации *PPM1G* и USP7S из цельных клеточных экстрактов, полученных из неповрежденных клеток или после их обработки ИР, было установлено, что генотоксический стресс не оказывает положительного влияния на образование белкового комплекса между данными белками (см. Рис. 3.28 диссертации). Полученные данные

указывают на потенциальную роль изменяющейся в ответ на повреждения ДНК активности PPM1G в наблюдаемом дефосфорилировании USP7S.

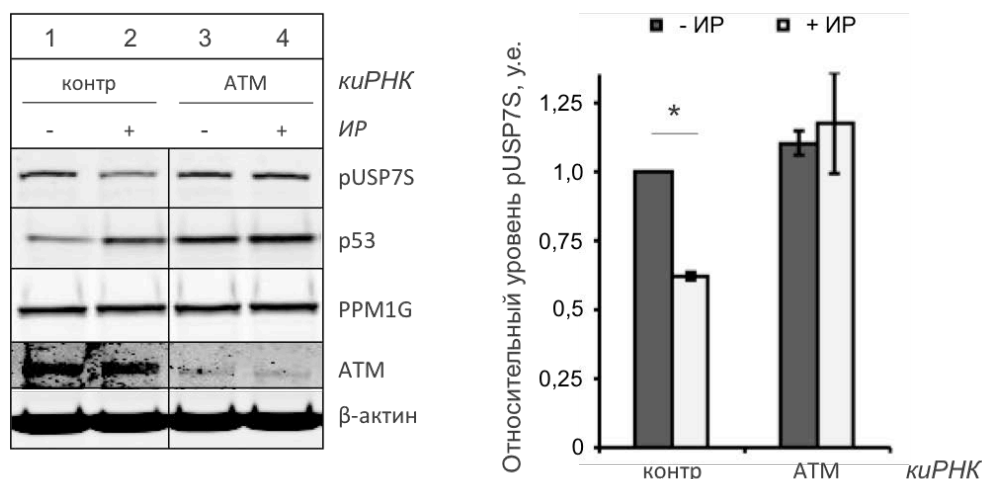


**Рис. 12.** PPM1G-зависимая регуляция стабильности USP7S и MULE в ответ на повреждения ДНК. **А-Б.** Нокадаун экспрессии PPM1G (200 пмоль киРНК, 60 ч) с **Б**) последующей обработкой клеток 10 Гр ИР. Клетки **А**) HCT116 p53<sup>+/+</sup> и **Б**) TIG-1; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину; \*P < 0,05, \*\*P < 10<sup>-4</sup> по данным 3-х экспериментов.

## РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ PPM1G В ОТВЕТ НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК

Для выявления белков, контролирующих активность PPM1G в ответ на повреждения ДНК, был проведен глубокий поиск сенсоров или преобразователей сигнала в рамках клеточного ответа на генотоксический стресс, которые взаимодействуют с PPM1G, с использованием литературы и хранилищ данных масс-спектрометрических экспериментов PRIDE и The Global Proteome Machine Organization. Было обнаружено, что, по данным полногеномного анализа белков, фосфорилируемых в ответ ИР, PPM1G является субстратом протеинкиназы ATM, играющей роль белка-преобразователя в клеточном ответе на ДР [Matsuoka S. *et al.*, 2007]. Соответственно, возник вопрос, является ли дефосфорилирование USP7S, наблюдаемое в ответ на повреждения ДНК, ATM-зависимым процессом. При обработке ATM-дефицитных клеток ИР было показано, что дефосфорилирование USP7S в ответ на повреждения ДНК происходит лишь в присутствии ATM (рис. 13, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что дефосфорилирование USP7S фосфатазой PPM1G в ответ на генотоксический стресс является

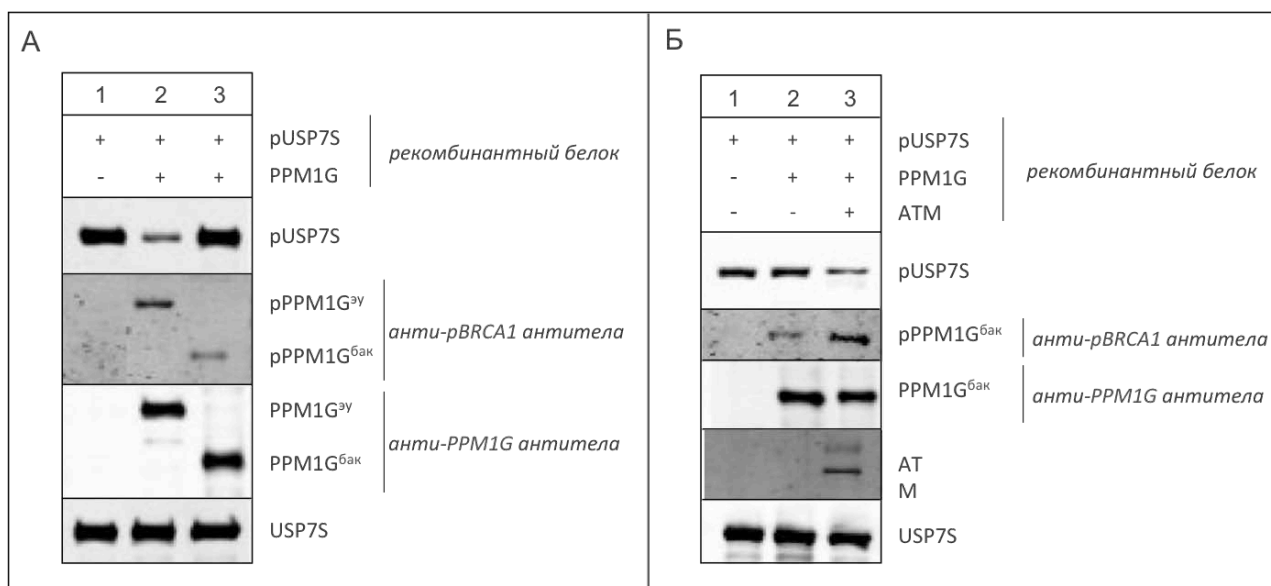
АТМ-зависимым процессом. Отметим, что, несмотря на относительно высокую стабильность USP7S в отсутствие АТМ, нокаун экспрессии АТМ привел к значительному повышению клеточного уровня экспрессии p53, причем последний существенно не увеличился после обработки АТМ-дефицитных клеток ИР (рис. 13, дорожки 3, 4 по сравнению с дорожкой 1). Подобный эффект связан с существованием альтернативных путей индукции p53-зависимого клеточного ответа на повреждения ДНК в отсутствие АТМ, регулируемых, например, родственными киназами семейства PIKK, включая ATR и ДНК-ПКс [Kim S.T. *et al.*, 1999; Tibbetts R.S. *et al.*, 1999].



**Рис. 13.** Дефосфорилирование USP7S в ответ на повреждения ДНК зависит от статуса киназы АТМ. Нокаун экспрессии АТМ (200 пмоль киРНК, 60 ч) с последующей обработкой клеток 10 Гр ИР. Клетки TIG-1; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину; \* $P < 10^{-9}$  по данным 3-х независимых экспериментов.

Для выяснения действительно ли АТМ-зависимое фосфорилирование контролирует фосфатазную активность PPM1G была проведена очистка рекомбинантной фосфатазы из двух источников: PPM1G<sup>эу</sup> была получена из эукариотических клеток с использованием системы для трансляции *in vitro*, тогда как человеческую рекомбинантную PPM1G<sup>бак</sup> выделяли из клеток *E.coli* (рис. 14А, дорожки 2 и 3, соответственно). В результате иммуноблотинга с использованием анти-pBRCA1 антител, которые распознают фосфорилированные мотивы аминокислот SQ/TQ, являющиеся консенсусными последовательностями киназы АТМ [Matsuoka S. *et al.*, 2007], было установлено, что очищенная из эукариотических клеток PPM1G<sup>эу</sup> частично фосфорилирована по АТМ-специфическим сайтам. Более того, PPM1G<sup>эу</sup> продемонстрировала фосфатазную активность в реакциях дефосфорилирования USP7S *in vitro* (рис. 14А, дорожка 2). В отличие от PPM1G<sup>эу</sup>, выделенная из бактериальных клеток PPM1G<sup>бак</sup> не является фосфорилированной, хотя и

демонстрирует незначительный уровень неспецифичной гибридизации с анти-pBRCA1 антителами, и не проявляет фосфатазной активности в реакциях дефосфорилирования USP7S *in vitro* (рис. 14А, дорожка 3). В дополнение было установлено, что результатом фосфорилирования неактивной PPM1G<sup>бак</sup> в присутствии очищенной из клеток человека рекомбинантной ATM (любезный дар Т. Paull) является индукция фосфатазной активности PPM1G<sup>бак</sup> в реакции дефосфорилирования USP7S (рис. 14Б, дорожка 3 по сравнению с дорожкой 2). Учитывая литературные данные по активации киназы ATM при обработке клеток ИР [Bakkenist C.J. & Kastan M.B., 2003], полученные результаты свидетельствуют о том, что ATM-зависимое фосфорилирование PPM1G, стимулируемое в ответ на повреждения ДНК через активацию ATM, необходимо для индукции фосфатазной активности фермента и последующего дефосфорилирования USP7S.

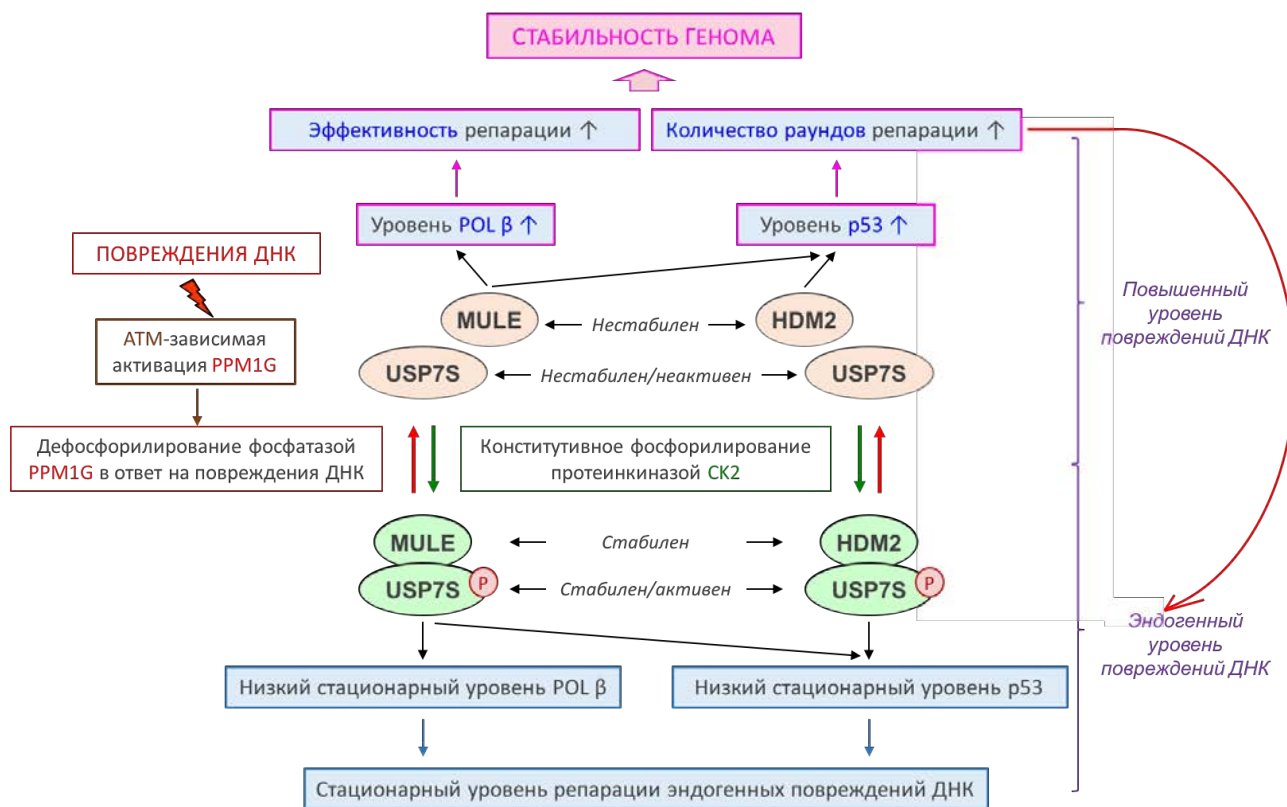


**Рис. 14.** ATM-зависимое фосфорилирование стимулирует активность PPM1G. **А-Б.** Реакции дефосфорилирования USP7S *in vitro* (2,8 пмоль) в присутствии эквимольных количеств рекомбинантной фосфатазы **(А)** PPM1G<sup>zy</sup>, полученной с использованием системы для трансляции *in vitro*, или PPM1G<sup>бак</sup>, очищенной из *E.coli*, и **(Б)** PPM1G<sup>бак</sup>, которая была фосфорилирована очищенной из клеток человека ATM (30 мин, 30 °С). Уровень ATM-зависимого фосфорилирования PPM1G (pPPM1G) определяли с использованием антител против фосфорилированного по остатку S1423 BRCA1 (pBRCA1). Разница в молекулярной массе между PPM1G<sup>zy</sup> и PPM1G<sup>бак</sup> обусловлена наличием GST-эпитопа в PPM1G<sup>zy</sup>.

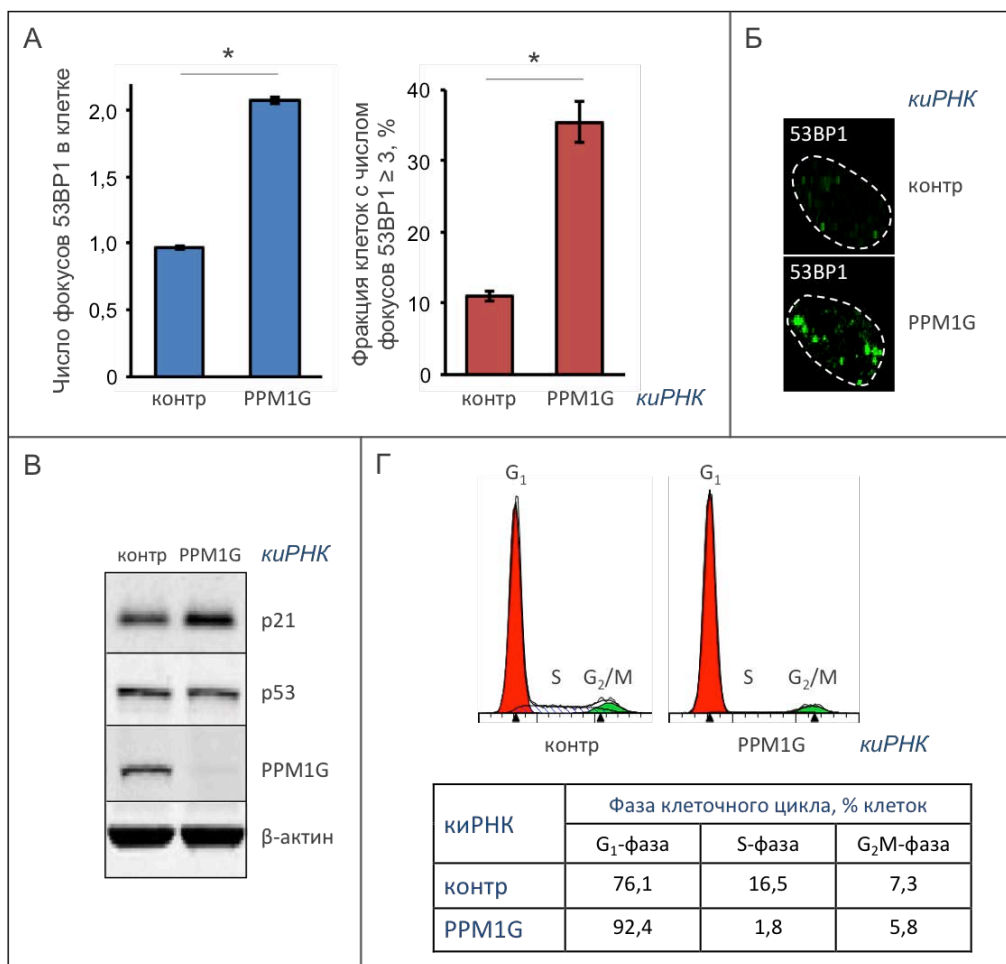
Суммируя полученные данные, было показано, что при повышении эффективного количества повреждений ДНК наблюдается ATM-зависимая стимуляция фосфатазной активности PPM1G с повышением эффективности дефосфорилирования USP7S по остатку S18 и последующей дестабилизацией/снижением активности фермента. К последствиям снижения уровня фосфорилирования USP7S относится протеасомная деградация HDM2 и



MULE с соответствующей стабилизацией p53 и POL β, обеспечивающими поддержание целостности генома через активацию клеточного ответа на повреждения ДНК и повышение эффективности систем ЭРО и ОР-репарации, соответственно (рис. 15). Полученные результаты согласуются с литературными данными о повышенной чувствительности PPM1G-дефицитных куриных клеток DT-40 к ИР-обработке в присутствии кофеина, ингибитора активности PIKK-киназ ATM и ATR [Kimura H. *et al.*, 2006]. Более того, одновременно с нашим открытием появились данные о колокализации PPM1G и γH2AX на сайте повреждений ДНК, индуцированных лазерной микрорадиацией, и S183 был биохимически идентифицирован в качестве сайта ATM-зависимого фосфорилирования PPM1G [Beli P. *et al.*, 2012], подчеркивая значимую биохимическую роль PPM1G в регуляции клеточного ответа на повреждения ДНК.



**Рис. 15.** Схема АТМ- и PPM1G-зависимой регуляции POL β и p53 в ответ на повреждения ДНК. В неповрежденных клетках конститутивное фосфорилирование остатка S18 в USP7S киназой CK2 необходимо для поддержания стабильности и активности фермента. Соответственно, стационарный уровень белкового содержания MULE и HDM2, являющихся субстратами USP7S, относительно высок, тогда как содержание POL β и p53 сравнительно низко. В ответ на повреждения ДНК происходит АТМ-зависимая индукция фосфатазной активности PPM1G фосфорилированием с последующим дефосфорилированием и дестабилизацией/снижением активности USP7S, сопровождающихся дестабилизацией MULE и HDM2. В результате наблюдается более эффективная репарация повреждений оснований ДНК и ОР за счет повышенного количества POL β и активация p53-зависимого клеточного ответа. Регуляторная петля замыкается по факту репарации избытка повреждений ДНК.



**Рис. 16.** Остановка клеточного цикла и накопление фокусов 53BP1 в PPM1G-дефицитных клетках. А-Г. Анализ PPM1G-дефицитных клеток (200 пмоль *киРНК*, 60 ч) методами (А-Б) иммунофлуоресценции с подсчетом числа фокусов ДР-маркера 53BP1, (В) иммуноблотинга и (Г) проточной цитометрии. Клетки TIG-1; контр – контроль; \* $P < 10^{-6}$  по данным 4-х экспериментов.

Отметим, что киназа АТМ играет роль эффектора в обсуждаемом сигнальном каскаде. Можно предположить, что величина сигнала в рамках данного каскада, условно выражаемая клеточным уровнем содержания p53 и эффективностью ЭРО и ОР-репарации, обеспечивает высокоточную и координированную p53-зависимую регуляцию клеточного цикла, в частности, времени перехода из фазы G<sub>1</sub> в S (немедленный переход в отсутствие повреждений ДНК или задержка клеточного цикла на время, необходимое для репарации или инициации апоптоза в случае нерепарируемого уровня повреждений ДНК) и процесса репарации ДНК путем модуляции уровня содержания POL β. В соответствии с предложенной схемой (рис. 15), клетки в отсутствие PPM1G в начальный момент времени отражают поведение p53-дефицитных клеток, поскольку сигнальный каскад в подобном случае оказывается нефункциональным, результатом чего должен быть переход G<sub>1</sub>-S без задержки для репарации и накопление повреждений ДНК. В полном соответствии с данным предположением было установлено, что в отсутствие функциональной PPM1G клетки

обладают пониженной способностью к репарации эндогенных повреждений ДНК и/или проявляют относительно неэффективный/замедленный чекпойнт-контроль, что приводит к накоплению нерепарированных ДР как показано при оценке числа фокусов ДР-маркера 53BP1 (рис. 16А-В).

Несмотря на то, что уровень белкового содержания p53 не претерпел изменений при кРНК-подавлении экспрессии *PPM1G*, задержка клеточного цикла в фазе G<sub>1</sub> в PPM1G-дефицитных клетках нормальных первичных фибробластов человека наблюдалась (рис. 16В-Г). Подобная задержка репликации ДНК с высокой вероятностью обеспечивается p53-независимым накоплением ингибитора циклин-зависимых киназ p21/WAF1 (далее p21) на поздних стадиях клеточного ответа на нерепарированные повреждения ДНК (рис. 16В; [Aliouat-Denis C.M. *et al.*, 2005]). Действительно, в PPM1G-дефицитных клетках наблюдалась частая детекция укрупненных фокусов 53BP1, иначе называемых ядерными тельцами (рис. 16Б), которые образуются в фазе клеточного цикла G<sub>1</sub> в результате митотического переноса нерепарированных повреждений ДНК в дочернюю клетку [Lukas C. *et al.*, 2011]. Следует подчеркнуть, что описанные выше механизмы обеспечения целостности генома нехарактерны для раковых клеток, в которых в отсутствие PPM1G на фоне практически нефункционального за счет низкого уровня содержания или мутантного p53 наблюдается повышенная скорость пролиферации, несмотря на присутствие нерепарированных повреждений ДНК [Suh E.J. *et al.*, 2006; Sun C. *et al.*, 2016].

В дополнение к полученным в настоящем исследовании результатам о значимости PPM1G в поддержании целостности генома в ответ на изменения эффективной клеточной нагрузки по повреждениям ДНК говорят данные о повышенной чувствительности мышинных эмбриональных фибробластов *Ppm1g*<sup>-/-</sup> к окислительному стрессу [Foster W.H. *et al.*, 2013]. Следует также отметить, что нокаут *Ppm1g* у мышей приводит к гибели эмбрионов из-за повышенного уровня апоптоза, который в значительной степени наблюдается в тканях мозга. Несмотря на то, что формального объяснения данного факта в настоящий момент не предложено, это может быть связано с низким пороговым уровнем индуцирующих апоптоз нерепарированных повреждений ДНК в процессе раннего развития [Gatz S.A. *et al.*, 2011]. Логичным является предположение о том, что нарушения координации репарации ОР и повреждений оснований ДНК в отсутствие PPM1G, описанные в настоящем исследовании, будут особенно пагубны в клетках развивающегося мозга, обладающих высоким уровнем транскрипционной и пролиферативной активности. Наконец, было показано, что фосфатаза

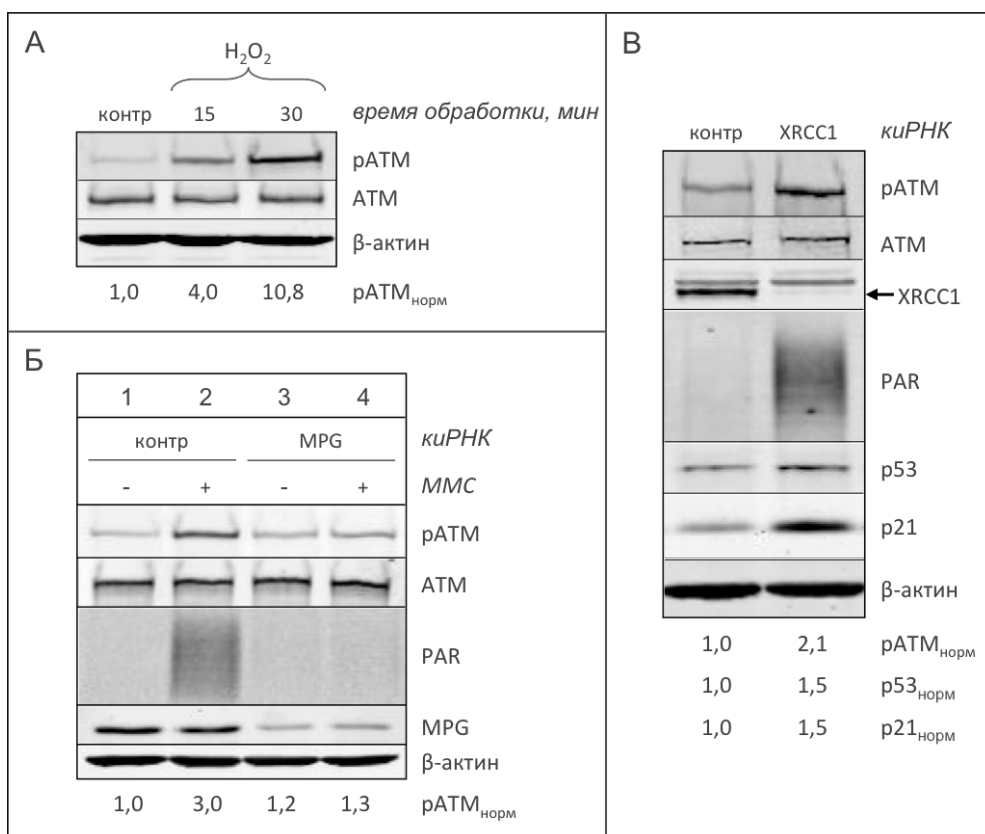
PPM1G положительно контролирует уровень экспрессии принадлежащего к семейству p53 опухолевого супрессора p73 и является отрицательным регулятором функционально противостоящей ему изоформы  $\Delta Np73$  [Chaudhary N. & Maddika S., 2014]. Таким образом, учитывая результаты настоящего исследования о роли PPM1G в регуляции p53-зависимого ответа и эффективности систем ЭРО и ОР-репарации в ответ на повреждения ДНК и на текущий момент ограниченные литературные данные о других клеточных функциях данной фосфатазы, можно рассуждать о функциональной значимости PPM1G в качестве опухолевого супрессора.

### **АКТИВАЦИЯ АТМ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМИ РАЗРЫВАМИ ДНК**

В настоящей работе было показано, что координация репарации ОР и прогрессии клеточного цикла контролируется через MULE- и HDM2-зависимую модуляцию стабильности POI  $\beta$  и p53. В свою очередь, уровень экспрессии MULE и HDM2 контролируется посттрансляционными модификациями PPM1G и USP7S в ответ на изменение уровня повреждений ДНК, причем одним из первоначальных событий подобного каскада является индукция киназной активности АТМ (см. рис. 15). Соответственно, возник вопрос о модуляции активности АТМ в ответ на повреждения оснований ДНК и ОР, а также о независимости подобного явления от канонической индукции киназной активности АТМ в ответ на образование ДР в соответствии с MRN-зависимым механизмом [Carson C.T. *et al.*, 2003; Uziel T. *et al.*, 2003].

**Нарушения репарации ОР индуцируют активность АТМ.** Для выяснения, вызывают ли повреждения оснований ДНК и/или ОР активацию АТМ, была проведена обработка нормальных первичных фибробластов человека TIG-1 пероксидом водорода, индуцирующим образование значительного количества ОР среди прочих повреждений ДНК, и алкилирующим основания ДНК метилметансульфонатом (ММС). При этом было обнаружено увеличение уровня самофосфорилирования АТМ по аминокислотному остатку S1981 (pATM), отражающего активность киназы (рис. 17А-Б; [Bakkenist C.J. & Kastan M.B., 2003]). При исследовании кинетики S1981-фосфорилирования АТМ в зависимости от времени репарации и дозы ММС была обнаружена прямая корреляция между уровнями pATM и полимеров ADP-рибозы PAR (см. рис. 3.32Б и 3.33 диссертации). Полученные данные указывают на то, что активность АТМ с большой вероятностью индуцируется в ответ на повышение уровня поврежденных оснований и/или разрывов ДНК.

Для детального исследования вопроса о типе повреждений ДНК, вызывающих самофосфорилирование ATM в ответ на обработку клеток ММС, стадия выщепления метилированных оснований ДНК в рамках ЭРО была блокирована с использованием кнРНК-нокдауна экспрессии гена N-метилпурин-ДНК-гликозилазы *MPG* [Jacobs A.L. & Schar P., 2012]. В соответствии с первичной ролью *MPG* в инициации репарации метилированных оснований ДНК, индуцируемых ММС, в отсутствие *MPG* не наблюдали синтеза PAR, что также сопровождалось потерей фосфорилирования ATM по остатку S1981 (рис. 17Б, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2; см. также рис. 3.34 диссертации). Полученные результаты свидетельствуют о том, что образование именно разрывов ДНК (в первую очередь ОР, хотя на данном этапе работы нельзя исключить и ДР-зависимую активацию ATM) в процессе ЭРО, а не поврежденных оснований ДНК является причиной S1981-фосфорилирования и активации ATM.



**Рис. 17.** Активация ATM через самофосфорилирование по остатку S1981 в ответ на экзо- и эндогенные ОР. **А-Б.** Обработка клеток **(А)** 150 мкМ пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) или **(Б)** 1 мМ ММС после кнРНК-нокдауна экспрессии *MPG* (200 пмоль кнРНК, 60 ч). **В.** Трансфекция клеток кнРНК против *XRCC1* (200 пмоль, 60 ч). Клетки TIG-1; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по ATM и β-актину.

С целью исследования биохимической значимости полученных результатов было проведено кратковременное кнРНК-зависимое снижение экспрессии *XRCC1*, необходимого

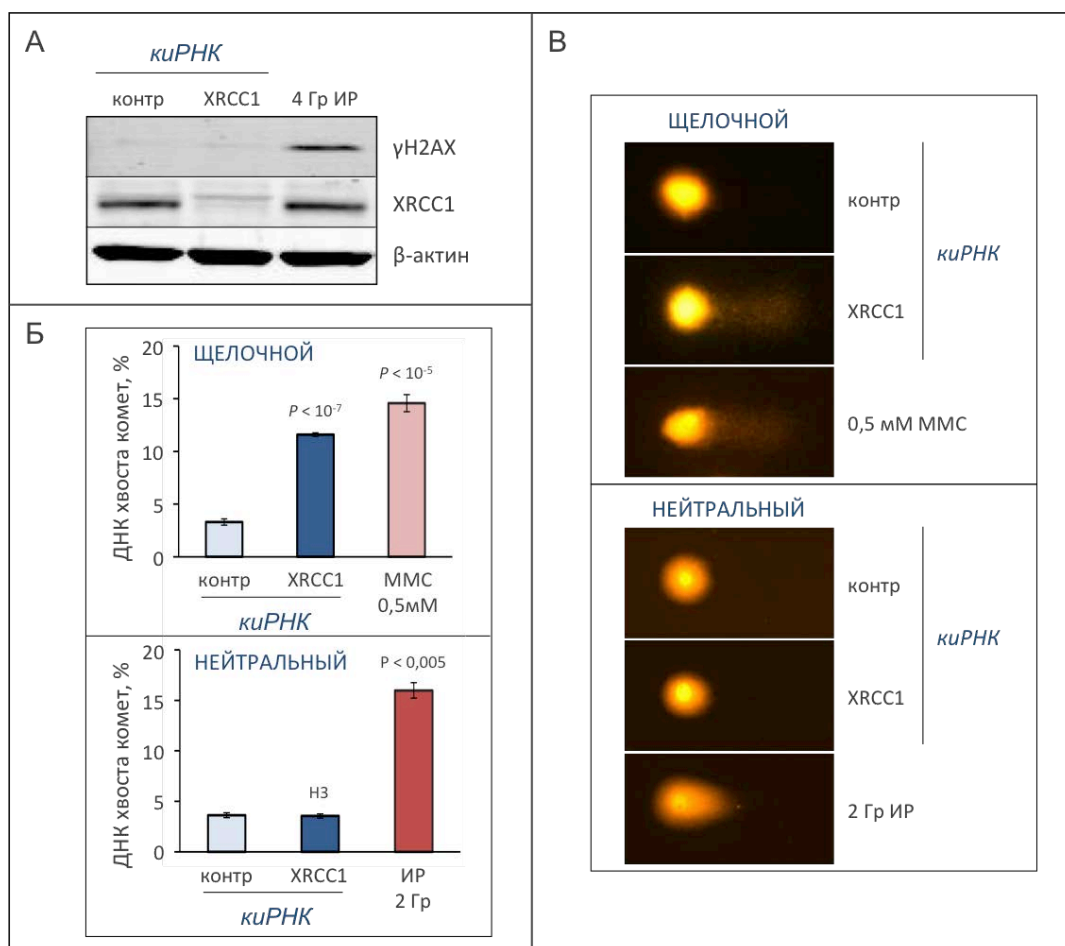
для лигирования ДНК в процессах ЭРО и ОР-репарации [Caldecott K.W., 2003]. При этом происходило процессирование десятков тысяч эндогенных поврежденных оснований ДНК системой ЭРО с образованием ОР, а также накопление эндогенных ОР (рис. 17В). Отметим, что накопление нерепарированных ОР происходило постепенно и коррелировало со временем кИРНК-обработки (см. рис. 3.35Б диссертации). При этом наблюдалось постепенное увеличение уровня S1981-фосфорилированной АТМ, сопровождающееся активацией фермента как следует из накопления p53 и p21 (рис. 17В; см. также рис. 3.35Б-В диссертации).

Обобщая, было показано, что самофосфорилирование по остатку S1981 и активация АТМ индуцируются нерепарированными ОР в ответ на обработку клеток человека ММС, алкилирующим основания ДНК, и в отсутствие эффективного лигирования эндогенных ОР в клетках, в которых уровень экспрессии *XRCC1* понижен до 5-10 % от исходного с использованием кИРНК. Отметим, что, хотя в случае обеих типов обработки клеток прямого образования ДР не происходит, проведенные эксперименты не позволяют исключить образование незначительного количества ДР в результате репликации ОР-содержащей ДНК [Zhou W. & Doetsch P.W., 1993]. Учитывая то, что ДР являются каноническим активатором киназы АТМ, было важно изучить ДР-зависимую компоненту активации АТМ в ответ на нерепарированные ОР в клетках с низким уровнем содержания *XRCC1*.

**Активация АТМ в ответ на накопление нерепарированных ОР не связана с образованием репликационных ДР.** При оценке уровня фосфорилирования гистона H2AX по остатку S139 ( $\gamma$ H2AX), который является одним из ДР-маркеров [Rogakou E.P. et al., 1998], детекции  $\gamma$ H2AX в клетках, обработанных *XRCC1*-кИРНК, не наблюдали (рис. 18А). Учитывая относительно невысокую чувствительность метода иммуноблотинга полученные данные позволяют исключить образование если не всех, то значительного количества ДР в данной экспериментальной системе.

Для дальнейшего исследования наличия ДР в *XRCC1*-дефицитных клетках был использован метод гель-электрофореза единичных клеток (ДНК-комет) в условиях щелочного и нейтрального лизиса [Olive P.L. & Vanath J.P., 2006]. При использовании щелочного варианта метода, который позволяет детектировать ОР и ДР, наблюдалось повышенное количество разрывов ДНК в отсутствие *XRCC1* по сравнению с контролем, сравнимое с таковым, индуцируемым при обработке клеток 0,5 мМ ММС в течение 30 мин (рис. 18Б-В, верхние панели). В то же время при детекции специфически ДР с

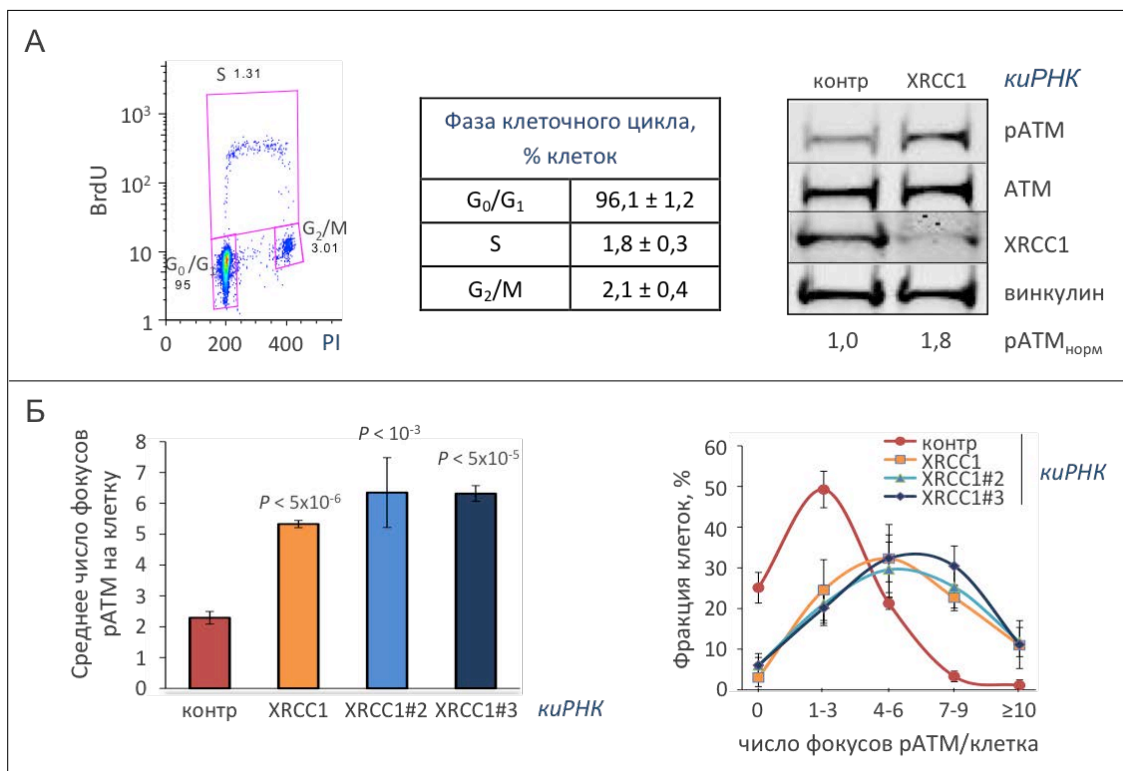
использованием метода ДНК-комет в условиях нейтрального лизиса образования повышенного количества разрывов ДНК в XRCC1-дефицитных клетках по сравнению с контролем не наблюдали, несмотря на отчетливую детекцию ДР после обработки клеток 2 Гр ИР (рис. 18Б-В, нижние панели). Полученные результаты указывают на то, что разрывы ДНК, образующиеся в результате подавления экспрессии XRCC1 с использованием киРНК, являются одноцепочечными.



**Рис. 18.** Активация ATM эндогенными ОР в XRCC1-дефицитных клетках не связана с образованием ДР. **А.** Трансфекция клеток киРНК против XRCC1 (200 пмоль, 60 ч) с последующей детекцией γH2AX. **Б.** Детекция уровня повреждений ДНК методом ДНК-комет в условиях щелочного или нейтрального лизиса. Клетки TIG-1; контр – контроль; положительный контроль – 2-4 Гр ИР и 0,5 мМ ММС (30 мин); уровень значимости по данным 5-ти независимых экспериментов, НЗ – незначимо ( $P > 0,05$ ).

С целью исключения недостаточно высокой чувствительности детекции ДР вышеописанными методами иммуноблотинга и ДНК-комет было проведено исследование активации ATM в ОР-содержащих нереплицирующихся (покоящихся) культурах клеток нормальных первичных фибробластов человека TIG-1, пролиферация которых была обратимо ингибирована путем контактного (плотностно-зависимого) торможения [Abercrombie M., 1970]. При анализе распределения покоящихся клеток, в которых индукцию

нерепарированных ОР осуществляли путем кiPHK-нокдауна экспрессии *XRCC1*, по фазе клеточного цикла методом проточной цитометрии было установлено, что порядка 96 % клеток находятся в фазе  $G_0/G_1$ . При этом наблюдали увеличение уровня фосфорилирования ATM по остатку S1981 по сравнению с контролем, что указывает на предрепликационную активацию ATM в фазе клеточного цикла  $G_0/G_1$  (рис. 19A). Аналогичные результаты были получены в поющих клетках, обработанных MMC (см. рис. 3.37 диссертации).



**Рис. 19.** Активация ATM нерепарированными ОР происходит в  $G_0/G_1$ -клетках. Покоящиеся клетки обрабатывали кiPHK против *XRCC1* (200 пмоль) и инкубировали в присутствии EdU (1 мкМ, 60 ч). Анализ образцов методами **(А)** проточной цитометрии после инкубации с 5-бром-2'-дезоксигидроуридином (BrdU, 10 мкМ, 20 мин) и окрашиванием ДНК йодидом пропидия (PI) и иммуноблотинга и **(Б)** иммунофлуоресценции на число фокусов pATM в EdU-отрицательных ( $G_0/G_1$ ) клетках. Клетки TIG-1; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по ATM и винкулину; численные данные и уровень значимости по данным 3-х и более экспериментов.

С учетом идентификации незначительной фракции поющих XRCC1-дефицитных клеток в фазах S и  $G_2/M$  клеточного цикла (~1,8 и 2,1 %, соответственно; рис. 19A) дальнейший анализ S1981-фосфорилирования ATM проводили методом иммунофлуоресценции на уровне единичных клеток. Для анализа использовали поющие клетки в фазе клеточного цикла  $G_0/G_1$ , которые идентифицировали по отсутствию включения аналога тимидина, 5-этинил-2'-дезоксигидроуридина (EdU), добавленного в среду для культивирования клеток одновременно с их обработкой XRCC1-кiPHK (см. рис. 3.38А-Б



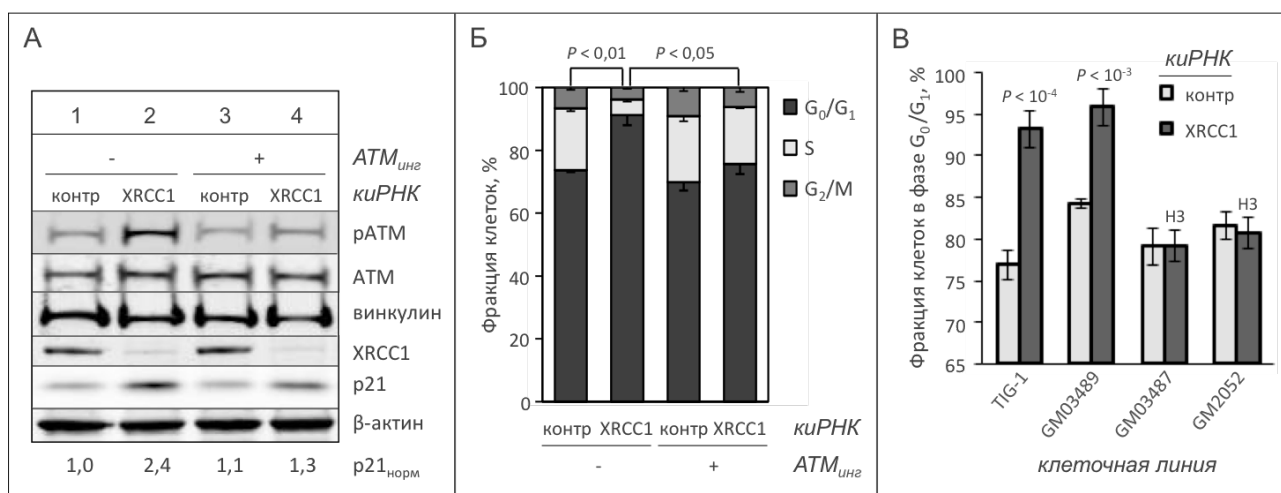
диссертации). Было установлено, что в ответ на нерепарированные ОР в нереплицирующихся XRCC1-дефицитных клетках наблюдается увеличение среднего количества фокусов фосфорилированной по остатку S1981 формы ATM по сравнению с контрольными клетками (рис. 19Б, левая панель). Более того, в присутствии нерепарированных ОР наблюдалось существенное увеличение фракции клеток, содержащих многочисленные (7 и более) фокусы pATM (рис. 19Б, правая панель). Аналогичные результаты были получены при использовании 3-х различных последовательностей кнРНК против XRCC1 (рис. 19).

Суммируя, было показано, что фосфорилирование ATM по остатку S1981 индуцируется нерепарированными ОР, которые накапливаются при кратковременном снижении уровня экспрессии XRCC1 с использованием кнРНК. В поддержку данного вывода говорит отсутствие репликационных (и других) ДР в нереплицирующихся XRCC1-дефицитных клетках, что позволяет исключить ДР-зависимую активацию ATM в используемой экспериментальной системе. Отметим, что в дополнение к ДР ионизирующая радиация индуцирует образование значительных количеств ОР и повреждений оснований ДНК [Roots R. *et al.*, 1985]. Соответственно, описанная в данной работе ОР-зависимая активация ATM может вносить вклад в каноническую ДР-зависимую активацию киназы в ответ на облучение ИР, хотя вопрос о количественной компоненте подобного вклада остается открытым.

**ОР-зависимая активация ATM замедляет вход клеток с поврежденной ДНК в фазу S клеточного цикла.** Поскольку наблюдаемая активация киназы происходит перед репликацией ДНК в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-клетках, было высказано предположение, что функцией ATM-зависимого клеточного ответа может являться задержка входа клеток с нерепарированными ОР в S-фазу клеточного цикла с целью репарации повреждений ДНК перед ее репликацией и, соответственно, избежания образования высокомутатогенных репликационных ДР. Действительно, при обработке клеток KU55933, специфическим ингибитором активности ATM, было установлено, что накопление ингибитора циклин-зависимых киназ p21, индуцируемое XRCC1-нокдауном в присутствии нерепарированных ОР, зависит от киназной активности ATM (рис. 20А; см. также рис. 3.40Б диссертации). При прямом измерении распределения клеток по фазам клеточного цикла методом проточной цитометрии было установлено, что нерепарированные ОР индуцируют задержку клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, причем для реализации данного эффекта необходимо присутствие активной ATM (рис. 20Б; см. также рис. 3.41 диссертации). При

культивировании XRCC1-дефицитных клеток в EdU-содержащей среде было показано, что задержка клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$  в ответ на нерепарированные ОР происходит именно в EdU-отрицательных клетках и в значительной степени обратима при обработке клеток KU55933 (см. рис. 3.42 диссертации), что однозначно подтверждает одноцепочечную природу разрывов ДНК, индуцирующую активность ATM и  $G_0/G_1$ -задержку клеточного цикла.

Наконец, при использовании нормальных фибробластов из пациентов с заболеванием атаксия телеангиэктазия (А-Т), характеризующимся мутациями в ATM с частичной или полной инактивацией функции киназы, было показано, что, в отличие от контрольных клеточных линий (TIG-1 и GM03489), в клетках А-Т (GM02052 и GM03487) не наблюдается задержки входа в S-фазу клеточного цикла в ответ на накопление нерепарированных ОР, индуцированное понижением экспрессии XRCC1 с использованием киРНК (рис. 20В; см. также рис. 3.43 диссертации).



**Рис. 20.** ATM-зависимая задержка клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$  в ответ на нерепарированные ОР. **А-Б.** Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК против XRCC1 (200 пмоль) и инкубировали в присутствии ингибитора активности ATM, KU55933 (1 мкМ, 60 ч) с анализом методами **(А)** иммуноблотинга и **(Б)** проточной цитометрии. **В.** Анализ задержки клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$  в нормальных фибробластах из пациентов с А-Т (GM03487 и GM02052) и контрольных клеточных линиях TIG-1 и GM03489 (здоровая мать GM03487). Контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину; уровень значимости по данным 3-х и более экспериментов, НЗ – незначимо ( $P > 0,05$ ).

Поскольку p21 является одним из генов, напрямую регулируемых транскрипционной активностью p53 [Miyashita, T. & Reed, J.C., 1995], а стабильность p53, в свою очередь, контролируется E3-убиквитинлигазами MULE и HDM2 через многоступенчатый каскад ATM-зависимых посттрансляционных модификаций фосфатазы PPM1G и убиквитин-специфической протеазы USP7S в ответ на повреждения ДНК (см. рис. 15), было высказано предположение, что регуляция клеточного цикла в ответ на ОР осуществляется в

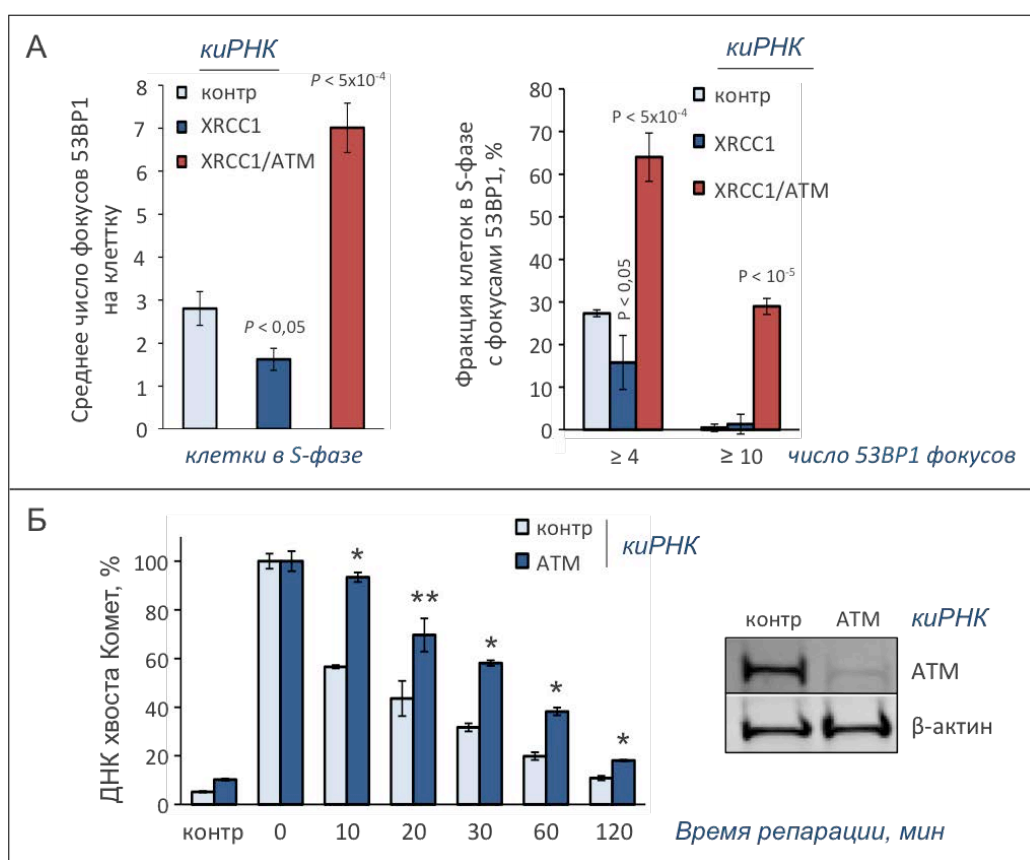
соответствии с p53-зависимым механизмом. Действительно, в ОР-содержащих p53-дефицитных клетках G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-задержки клеточного цикла не наблюдалось, подтверждая зависимость ATM-контролируемой сигнализации нерепарированных ОР от присутствия в клетках функционального p53 (см. рис. 3.44 диссертации).

В совокупности полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли ATM в регуляции p53-зависимой задержки входа клеток в фазу S клеточного цикла в ответ на нерепарированные ОР, причем подобная регуляция обеспечивается именно киназной активностью ATM, а не просто присутствием полноразмерного белка в клетках.

**ATM-зависимая сигнализация нерепарированных ОР в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> предотвращает образование высокомутагенных репликационных ДР.** Поскольку отсутствие в клетках функциональной ATM приводит к снятию блока их перехода в фазу S клеточного цикла даже в присутствии значительных количеств нерепарированных ОР (см. рис. 20 и рис. 3.43 диссертации), логично предположить, что в отсутствие ATM должно наблюдаться образование ДР в результате репликации ОР-содержащей ДНК. Для проверки данной гипотезы был проведен анализ эндогенного уровня ДР в ATM-дефицитных клетках, содержащих избыток нерепарированных ОР. При использовании метода ДНК-комет в условиях нейтрального лизиса было продемонстрировано накопление значительного количества ДР в отсутствие ATM в содержащих нерепарированные ОР XRCC1-дефицитных клетках, тогда как в ОР-содержащих клетках с функциональной ATM подобного эффекта не наблюдалось (см. рис. 3.45А-Б диссертации). В дополнение, культивирование клеток в присутствии EdU с последующей оценкой числа фокусов ДР-маркера 53BP1 в EdU-отрицательных (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазных) и EdU-положительных (прошедших через репликацию ДНК, S-фазных) клетках позволило установить, что увеличение среднего числа фокусов 53BP1 на клетку, а также процента клеток, содержащих многочисленные фокусы 53BP1, наблюдается специфически в фазе S клеточного цикла ATM-дефицитных клеток в ответ на нерепарированные ОР (рис. 21А). Более того, при обработке клеток ММС в присутствии ингибитора активности ATM было обнаружено, что для предотвращения образования репликационных ДР требуется именно киназная активность ATM (см. рис. 3.46 диссертации).

Отметим также, что неконтролируемое образование репликационных ДР в отсутствие функциональной ATM может быть в значительной степени связано с нарушениями положительной модуляции POL β-зависимой эффективности ЭРО и ОР-репарации в ответ на повреждения ДНК в соответствии с описанным выше многоступенчатым сигнальным

каскадом, включающим PPM1G, USP7S и MULE (см. рис. 15). Действительно, с использованием метода ДНК-комет было установлено, что эффективность репарации ОР в ATM-дефицитных клетках значительно ниже таковой по сравнению с клетками с функциональной ATM (рис. 21Б; см. также рис. 3.47 диссертации). Полученные данные свидетельствуют о важнейшей роли ATM в сигнализации присутствия нерепарированных ОР, биохимическим результатом которой является р53-зависимая регуляция длины фазы G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла в зависимости от уровня повреждений ДНК, а также POL β-зависимая модуляция эффективности репарации ДНК. В отсутствие функциональной ATM клетки неспособны к координации своевременной репарации ОР, что приводит к неконтролируемой репликации поврежденной ДНК и накоплению высокомутагенных ДР.



**Рис. 21.** ATM предотвращает образование мутагенных ДР путем координации репарации ОР в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла. **А.** Иммунофлуоресцентный анализ числа фокусов ДР-маркера 53BP1 в XRCC1- и XRCC1/ATM-дефицитных S-фазных клетках (200 пмоль *киРНК*, 1 мкМ EdU, 60 ч). **Б.** Кинетика репарации ОР (35 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 мин) в отсутствие ATM (200 пмоль *киРНК*, 60 ч). Клетки TIG-1; контр – контроль; уровень значимости по данным 3-х и более экспериментов, \* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,05$ .

### **Зависимость активации ATM нерепарированными ОР от активности PARP1.**

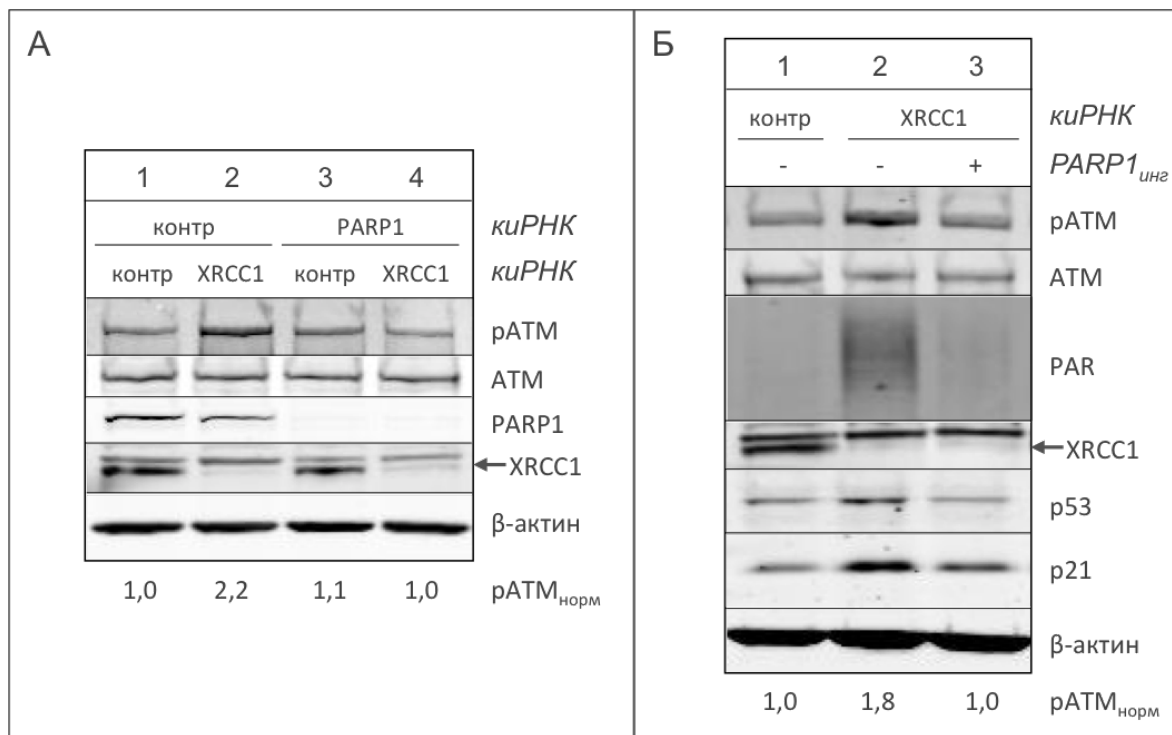
Важным является вопрос об уникальности ОР-зависимой активации ATM по сравнению с ранее описанными механизмами канонической MRN-зависимой активации ATM в ответ на

ДР [Bakkenist C.J. & Kastan M.B., 2003] и в условиях окислительного стресса через образование дисульфидной связи по остаткам цистеина 2991 [Guo Z. *et al.*, 2010b]. При оценке уровня фосфорилирования ATM по остатку S1981 после индукции нерепарированных ОР с использованием XRCC1-киРНК в MRE11- и NBS1-дефицитных клетках, а также в синхронизированных культурах нормальных фибробластов из пациентов с заболеванием, похожим на атаксию телеангиэктазию (ATLD), характеризующимся мутациями в гене *MRE11* [Stewart G.S. *et al.*, 1999], было показано, что активация ATM в ответ на нерепарированные ОР не зависит от присутствия компонентов MRN-комплекса (см. рис. 3.48 диссертации). Более того, при проведении белкового электрофореза цельных клеточных экстрактов в неденатурирующих условиях было установлено, что, в отличие от активированной активными формами кислорода димерной ATM, фосфорилированная по остатку S1981 форма киназы в ответ на нерепарированные ОР является мономером (см. рис. 3.49 диссертации), что указывает на независимость исследуемого механизма активации ATM от ранее описанного окисления дисульфидной связи. Полученные данные предполагают существование уникального механизма активации ATM в ответ на ОР.

Одним из классических сенсоров ОР является поли(ADP-рибозо)полимераза PARP1 [Shieh W.M. *et al.*, 1998]. В соответствии с этим было установлено, что активация ATM в ответ на нерепарированные ОР не наблюдается в отсутствие PARP1 (рис. 22А, дорожка 4 по сравнению с 2), а также блокирована при обработке клеток ингибитором активности членов семейства PARP, предотвращающим синтез PAR в ответ на ОР (рис. 22Б). Полученные результаты свидетельствуют о важности PARP1-зависимого синтеза поли(ADP-рибозы) в активации ATM в ответ на ОР. Отметим, что возможные молекулярные механизмы PARP1-зависимой активации ATM нерепарированными ОР подробно обсуждаются в разделе 4.5 диссертации, и их детальное исследование является одной из целей будущей работы.

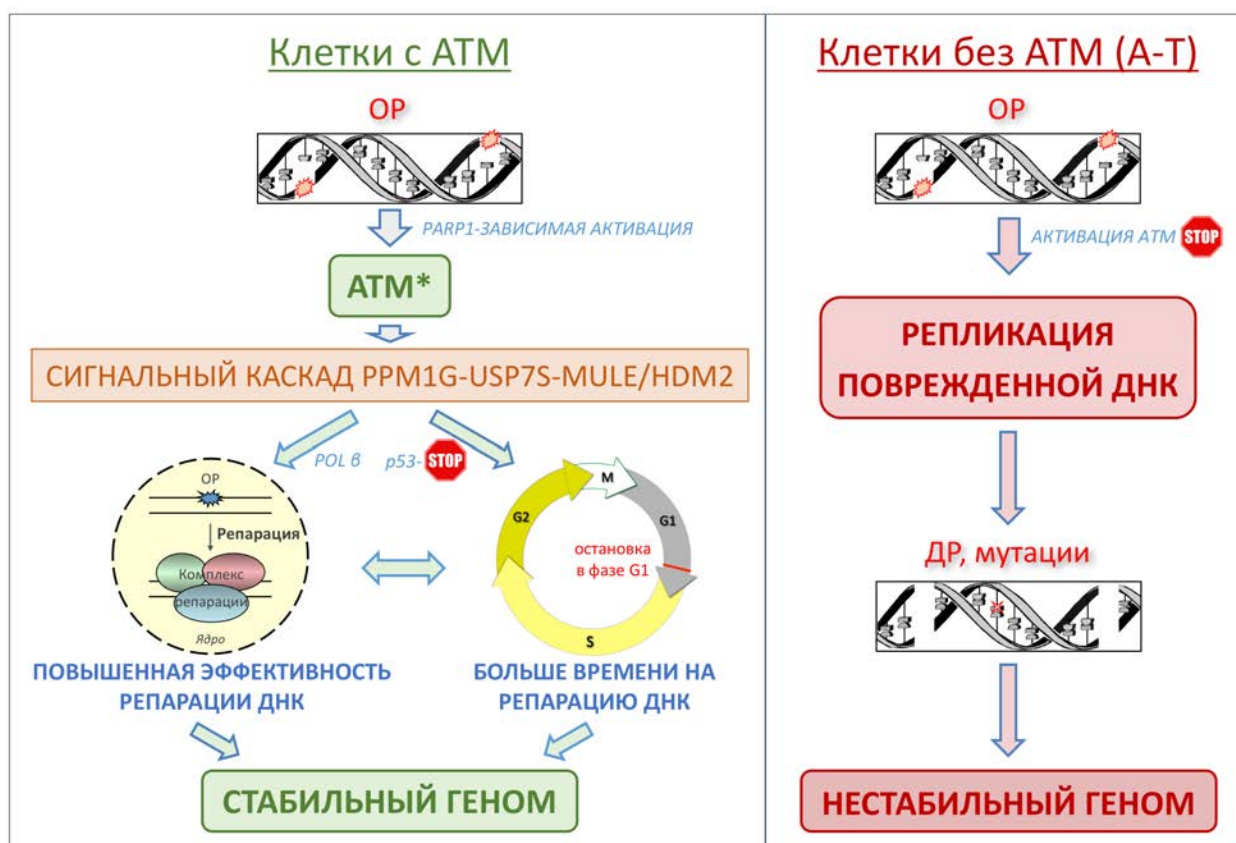
Обобщая, в настоящем исследовании было установлено, что PARP1-зависимая активация ATM в ответ на нерепарированные ОР обеспечивает запуск многоступенчатого сигнального каскада, функцией которого является координация своевременной и эффективной репарации ОР через POL  $\beta$ -зависимую модуляцию емкости системы ОР-репарации и p53-зависимую задержку входа клеток с поврежденной ДНК в фазу S клеточного цикла (рис. 23, левая панель). В отсутствие функциональной ATM, например, в клетках пациентов с заболеванием атаксиа телеангиэктазия (А-Т) описанной выше координации репарации ОР не происходит. В результате наблюдается неконтролируемая

репликация ОР-содержащей ДНК с образованием репликационных высокомутагенных ДР и повышенной частотой мутагенеза, вносящего вклад в характерный для данного заболевания фенотип нестабильности генома, являющийся первым вестником предрасположенности к раковым и другим патологическим состояниям (рис. 23, правая панель).



**Рис. 22.** Активация ATM нерепарированными ОР зависит от активности PARP1. **А.** Трансфекция киРНК (200 пмоль, 60 ч) против **(А)** *XRCC1*, *PARP1* или одновременно *XRCC1* и *PARP1* или **(Б)** *XRCC1* в присутствии ингибитора активности PARP1, NU1025 (10 мкМ, 60 ч). Клетки TIG-1; контр – контроль; денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по ATM и β-актину.

Выявленный в рамках настоящей работы многоступенчатый сигнальный каскад, регулируемый рядом посттрансляционных модификаций, и связывающий PARP1, ATM, PPM1G, USP7S, MULE и HDM2, p53 и ДНК-полимеразу β, представляет собой первый пример системы клеточного ответа на ОР. Подобный сигнальный механизм детекции нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК, сигнализации об их присутствии различным эффекторам клеточного ответа и обеспечении их эффективной репарации является неотъемлемым свойством клеток человека нормального происхождения и играет первостепенную роль в поддержании целостности генома путем своевременной и координированной репарации одноцепочечных разрывов ДНК и предотвращения образования высокомутагенных двуцепочечных разрывов ДНК.



**Рис. 23.** Схема клеточного ответа на нерепарированные ОР. В нормальных (АТМ-положительных) клетках PARP1- и АТМ-зависимый многоступенчатый сигнальный каскад обеспечивает координацию модулируемой POL β эффективной репарации ОР с регулируемым p53 контролем длины фазы G<sub>1</sub> клеточного цикла, в течение которого репарация ДНК и происходит (левая панель). В отсутствие подобного сигнального каскада в клетках пациентов с А-Т наблюдается неконтролируемая репликация ДНК, содержащей ОР, образование ДР и нестабильность генома (правая панель).

## ВЫВОДЫ

Настоящая работа представляет собой законченное систематическое научное исследование, в рамках которого впервые описана система клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК, регулируемая многоступенчатым каскадом посттрансляционных модификаций.

1. Показано, что ответом на повышение количества одноцепочечных разрывов ДНК является кратковременное снижение стабильности E3-убиквитинлигазы MULE. Установлена биохимическая значимость подобного явления, связанная с обеспечением повышенной стабильности субстратов данного фермента, среди которых находятся ДНК-полимераза β, а также супрессор опухолевого роста p53.

2. Выявлен механизм регуляции стационарного уровня содержания MULE через поддержание баланса процессов самоубиквитинирования и деубиквитинирования специфической S18-содержащей изоформой USP7S убиквитин-специфической протеазы USP7. Показано, что пониженная стабильность MULE в ответ на одноцепочечные разрывы ДНК связана с кратковременным снижением уровня экспрессии USP7S.
3. Установлено, что USP7S является основным регулятором стабильности E3-убиквитинлигазы HDM2 и, опосредованно, p53, несмотря на относительно низкое содержание USP7S среди других изоформ фермента (3-5 %). Показано, что в неповрежденных клетках бóльшая часть USP7S (60-80 %) фосфорилирована по остатку серина 18, и данная посттрансляционная модификация обеспечивает стабильность и активность фермента.
4. Проведена биохимическая идентификация киназы и фосфатазы, в совокупности ответственных за поддержание клеточного статуса фосфорилирования USP7S по остатку серина 18. Показано, что фосфорилирование осуществляется конститутивно активной киназой 2, тогда как за дефосфорилирование S18 в USP7S ответственна фосфатаза PPM1G.
5. Продемонстрирована активация фосфатазы PPM1G в ответ на одноцепочечные разрывы ДНК, которая индуцируется фосфорилированием киназой ATM. Установлено, что снижение стабильности USP7S, а также субстратов фермента MULE и HDM2 в ответ на повреждения ДНК, является ATM- и PPM1G-зависимым процессом.
6. Открыто явление активации ATM в ответ на нерепарированные одноцепочечные разрывы ДНК эндогенной и экзогенной природы. Доказано, что подобная неканоническая активация ATM происходит в отсутствие двуцепочечных разрывов ДНК и не зависит от присутствия компонентов MRN-комплекса или окисления аминокислотных остатков цистеина с образованием дисульфидных связей. В качестве сенсора нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК в контексте активации ATM предложена поли(ADP-рибозо)полимераза PARP1, и продемонстрирована важность PARP1-зависимого синтеза поли(ADP-рибозы) в данном процессе.
7. Показано, что результатом активации ATM в ответ на нерепарированные одноцепочечные разрывы ДНК является p53-зависимая задержка входа клеток с поврежденной ДНК в фазу S клеточного цикла, обеспечивающая дополнительное время для репарации ДНК перед ее репликацией. Параллельно наблюдается ATM-зависимое



повышение эффективности системы эксцизионной репарации оснований и одноцепочечных разрывов ДНК за счет стабилизации ДНК-полимеразы  $\beta$  в условиях пониженной стабильности MULE. Результатом подобной координации процессов репарации ДНК и прогрессии клеточного цикла является своевременная репарация одноцепочечных разрывов ДНК и предотвращение образования репликационных двуцепочечных разрывов ДНК, являющихся одним из важных источников нестабильности генома в ATM-дефицитных клетках пациентов с заболеванием атаксия телеангиэктазия. Таким образом, раскрыта ключевая роль киназы ATM в координации своевременной и эффективной репарации одноцепочечных разрывов ДНК в соответствии с многоступенчатым сигнальным каскадом:

PARP1—ATM—PPM1G—USP7S—MULE и HDM2—p53 и ДНК-полимераза  $\beta$ .

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в научных журналах*

1. Parsons J.L., Tait P.S., Finch D., Dianova I.I., Edelman M.J., **Khoronenkova S.V.**, Kessler B.M., Sharma R.A., McKenna W.G., Dianov G.L. Ubiquitin ligase ARF-BP1/Mule modulates base excision repair. // *EMBO Journal*. – 2009. – V. 28. – № 20. – P. 3207-3215.
2. **Khoronenkova S.V.**, Dianova I.I., Parsons J.L., Dianov G.L. USP7/HAUSP stimulates repair of oxidative DNA lesions. // *Nucleic Acids Reseach*. – 2011. – V. 39. – № 7. – P. 2604-2609.
3. Parsons J.L., Dianova I.I., **Khoronenkova S.V.**, Edelman M.J., Kessler B.M., Dianov G.L. USP47 is a deubiquitylating enzyme that regulates base excision repair by controlling steady-state levels of DNA polymerase  $\beta$ . // *Molecular Cell*. – 2011. – V. 585. – № 18. – P. 609-615.
4. **Khoronenkova S.V.**, Dianov G.L. The emerging role of Mule and ARF in the regulation of base excision repair. // *FEBS Letters*. – 2011. – V. 41. – № 5. – P. 2831-2835.
5. Altun M., Kramer H.B., Willems L.I., McDermott J.L., Leach C.A., Goldenberg S.J., Suresh Kumar K.G., Konietzny R., Fischer R., Kogan E., Mackeen M.M., McGouran J., **Khoronenkova S.V.**, Parsons J.L., Dianov G.L., Nicholson B., Kessler B.M. Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes. // *Chemistry & Biology*. – 2011. – V. 18. – № 11. – P. 1401-1412.
6. **Khoronenkova S.V.**, Dianova I.I., Edelman M.J., Kessler B.M., Parsons J.L., Dianov G.L. ATM-dependent down-regulation of USP7/HAUSP by PPM1G activates p53 response to DNA damage. // *Molecular Cell*. – 2012. – V. 45. – № 6. – P. 801-813.
7. **Khoronenkova S.V.**, Dianov G.L. Regulation of USP7/HAUSP in response to DNA damage: Yet another role for ATM. // *Cell Cycle*. – 2012. – V. 11. – № 13. – P. 2409-2410.
8. Parsons J.L., **Khoronenkova S.V.**, Dianova I.I., Ternette N., Kessler B.M., Datta P.K., Dianov G.L. Phosphorylation of PNKP by ATM prevents its proteasomal degradation and enhances resistance to oxidative stress. // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – V. 40. – № 22. – P. 11404-11415.
9. Zucca E., Bertolotti F., Wimmer U., Ferrari E., Mazzini G., **Khoronenkova S.V.**, Grosse N., van Loon B., Dianov G.L., Hübscher U., Maga G. Silencing of human DNA polymerase  $\lambda$  causes replication stress and is synthetically lethal with an impaired S phase checkpoint. // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – V. 41. – № 1. – P. 229-241.

10. **Khoronenkova S.V.**, Dianov G.L. USP7S-dependent inactivation of Mule regulates DNA damage signalling and repair. // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – V. 41. – № 3. – P. 1750-1756.
11. Orlando G., **Khoronenkova S.V.**, Dianova I.I., Parsons J.L., Dianov G.L. ARF induction in response to DNA strand breaks is regulated by PARP1. // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – V. 42. – № 4. – P. 2320-2329.
12. Hamilton G., Abraham A., Morton J., Sampson O., Pefani D., **Khoronenkova S.V.**, Grawenda A., Papaspyropoulos A., Jamieson N., Mackay C., Sansom O., Dianov G.L., O'Neill E. AKT regulates NPM dependent AR F localization and p53mut stability in tumors. // *Oncotarget*. – 2014. – V. 5. – № 15. – P. 6142-6167.
13. Goggolidou P., Stevens J., Agueci F., Keynton J., Wheway G., Grimes D.T., Patel S.H., Hilton H., Morthorst S.K., DiPaolo A., Williams D., Sanderson J., **Khoronenkova S.V.**, Powles-Glover N., Ermakov A.E., Esapa C.T., Romero R., Dianov G.L., Briscoe J., Johnson C.A., Pedersen L.B., Norris D.P. ATM-interactor (ATMIN) is a transcriptional regulator of both lung morphogenesis and ciliogenesis. // *Development*. – 2014. – V. 141. – № 20. – P. 3966-3977.
14. **Khoronenkova S.V.**, Dianov G.L. ATM prevents DSB formation by coordinating SSB repair and cell cycle progression. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112. – № 13. – P. 3997-4002.
15. **Хороненкова С.В.** Механизмы неканонической активации ATM-киназы. // *Успехи Биологической Химии*. – 2016. – Т. 56. – С. 197-210 (английский вариант статьи опубликован: **Khoronenkova S.V.** Mechanisms of non-canonical activation of Ataxia Telangiectasia Mutated. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – V. 81. – № 13. – С. 1669-1675).

#### **Тезисы конференций**

16. **Khoronenkova S.V.**, Dianova I.I., Parsons J.L., Dianov G.L. USP7 phosphorylation affects its stability, activity and stimulates repair of oxidative lesions. // *Proceedings of the 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the Radiation Research Society*. – Maui, USA, 2010. – P. 83.
17. **Khoronenkova S.V.**, Dianova I.I., Ternette N., Kessler B.M., Parsons J.L., Dianov G.L. Phosphorylation-dependent regulation of a specific USP7 isoform controls Mdm2 and p53 levels in response to DNA damage. // *Proceedings of the Charles Rodolphe Brupbacher Symposium on Cancer Genome and DNA Repair*. – Zurich, Switzerland, 2011. – P. 60.
18. **Khoronenkova S.V.**, Dianova I.I., Ternette N., Kessler B.M., Parsons J.L., Dianov G.L. ATM-dependent down-regulation of USP7/HAUSP by PPM1G activates p53 response to DNA damage. // *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Workshop on Mdm2*. – New York, USA, 2011. – P. P16.
19. **Khoronenkova S.V.**, Dianov G.L. Coordination of DNA damage signal transduction and DNA repair. // *Proceedings of the 6<sup>th</sup> DNA repair workshop*. – Smolenice, Slovakia, 2012. – P. L6.
20. **Khoronenkova S.V.**, Dianova I.I., Ternette N., Kessler B.M., Parsons J.L., Dianov G.L. Role of deubiquitylation in the DNA damage response: links to base excision repair. // *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Erling Seeberg Symposium on DNA Repair*. – Trondheim & Órland, Norway, 2012. – P. 19.
21. **Khoronenkova S.V.**, Dianov G.L. Molecular basis for the inhibition of USP7 deubiquitinase in cancer cells. // *Proceedings of the International Conference Biocatalysis-2013: Fundamentals & Applications*. – Moscow, Russia, 2013. – P. 29-30.
22. **Khoronenkova S.V.**, Dianov G.L. Coordination of DNA damage signalling and repair. // *Mutagenesis*. – 2014. – V. 29. – № 6. – P. 521-522.
23. **Khoronenkova S.V.**, Dianov G.L. Endogenous single strand breaks activate ATM to coordinate DNA repair with replication timing. // *Proceedings of the 5<sup>th</sup> US-EU International Conference on Repair of Endogenous DNA Damage*. – Santa Fe, USA, 2014. – P. 36.
24. **Khoronenkova S.V.**, Dianov G.L. SSBs activate ATM to prevent DSB formation. // *Proceedings of the Tomas Lindahl Conference on DNA Repair*. – Oslo, Norway, 2015. – P. 38.
25. Rosciglione S., **Khoronenkova S.V.** SSB signalling and neurodegeneration in Ataxia Telangiectasia. // *Proceedings of the Benzon Symposium on Genome Instability and Neurodegeneration (no. 62)*. – Copenhagen, Denmark, 2016. – P. 50.