

О Т З Ы В

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

Диссертационная работа Хороненковой С.В. посвящена изучению механизмов клеточного ответа на повреждения ДНК – важнейшему процессу поддержания целостности генома. Модификации структуры ДНК возникают ежедневно при действии внутриклеточных и внешних воздействий, таких как окислительный стресс, УФ-облучение, воздействие мутагенов окружающей среды, ионизирующая радиация. В большинстве случаев системы клеточного ответа обеспечивают репарацию повреждений ДНК, однако в редких случаях из-за их ошибочности или несвоевременного действия могут возникать нежелательные мутации, приводящие к нарушению процессов жизнедеятельности клетки. Одним из наиболее распространенных мутагенных повреждений ДНК являются одноцепочечные разрывы (ОЦР). На клеточном уровне ОЦР препятствуют процессам репликации и транскрипции. На уровне организма нарушения репарации ОЦР играют роль в развитии патологий, среди которых онкологические заболевания, заболевания центральной нервной системы и клеточное старение. Развивается интенсивный поиск мишеней среди ферментов репарации ДНК и связанных с этим процессом механизмов ответа на генотоксический стресс. Например, ингибирование активности ключевого регулятора репарации - поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1 (PARP1), катализирующей синтез поли(АДФ-рибозы) в ответ на появление в ДНК одноцепочечных разрывов, в последние годы одобрено к использованию для терапии определенных типов опухолей. В связи с этим исследование молекулярных механизмов и поиск новых ферментативных систем клеточного ответа на ОЦР является чрезвычайно актуальной научной задачей, представляющей значительный фундаментальный интерес и большую практическую значимость.

В диссертационной работе Хороненковой С.В. впервые проведено комплексное исследование ферментативных систем клеточного ответа на ОЦР. В частности, внимание автора работы сфокусировано на фундаментальных вопросах изучения механизмов сигнализации о возникновении ОЦР, а также координации репарации этих повреждений с процессами регуляции клеточного цикла. Среди прочих важных и неожиданных открытий в работе установлено, что после стадии распознавания ОЦР поли(АДФ-рибоза)полимеразой 1 центральную роль в сигнализации о нерепарированных повреждениях ДНК играет киназа АТМ. С.В. Хороненковой обнаружено, что АТМ обеспечивает пост-трансляционную

регуляцию системы многостадийного ферментного каскада, и описаны участвующие в этом процессе ферменты и механизмы их регуляции. Показано, что такой каскад координирует репарацию ОЦР как путем увеличения уровня ядерной концентрации ферментов репарации, так и времени репарации ДНК, предшествующей репликации. Это осуществляется путем контроля протяженности G1-фазы клеточного цикла. Подавляющее большинство результатов работы являются принципиально новыми и имеют большое фундаментальное значение для понимания регуляции репарации ОЦР. В целом, проведенное исследование можно рассматривать как важное достижение в области изучения сложных ферментных систем, регулирующих стабильность клеточного генома. Практическая важность работы состоит в том, что полученные данные о клеточной роли АТМ и других ферментов в ответе на ОЦР могут быть использованы для разработки новых подходов в противоопухолевой терапии.

Диссертационная работа изложена на 268 страницах текста и включает введение, четыре главы («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение результатов»), заключение и выводы. В работе содержатся 83 рисунка и 10 таблиц. Список литературы обширен и включает 633 наименования отечественных и зарубежных публикаций.

Во «Введении» автором рассмотрено современное состояние науки в области изучения процессов клеточного ответа на ОЦР и убедительно обоснована актуальность и степень разработанности темы исследования. Формулировка целей и задач работы является последовательной и логичной.

Обзор литературы в значительной степени посвящен обсуждению механизмов обеспечения целостности клеточного генома. Рассмотрены типы повреждений ДНК, механизмы эксцизионной репарации оснований (ЭРО) и репарации разрывов, а также достаточно хорошо изученные системы клеточного ответа на двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР). Важным и логичным для данной работы является раздел о клеточной функции киназы АТМ, известных механизмах активации АТМ в ответ на ДЦР и о заболевании атаксия телеангиэктазия, связанном с нарушениями функций этого фермента. Особо хочется подчеркнуть заключительный краткий раздел главы, в котором обобщены довольно ограниченные литературные данные, касающиеся регуляции концентрации ферментов ЭРО и репарации ОЦР в зависимости от уровня повреждений ДНК. Именно эти данные создают предпосылки к развитию темы диссертационной работы С.В. Хороненковой. Вся приведенная в главе информация важна для проведенного исследования, хорошо

структурирована и иллюстрирована. Следует отметить критическое обсуждение ряда опубликованных данных, что говорит о научной эрудированности автора.

В описании материалов и методов приведен перечень объектов исследования и описан широкий набор самых современных методов биохимии, биофизики и клеточной биологии. В своей работе автор уделяет значительное внимание использованию независимых клеточных линий человека, принципиально разных экспериментальных подходов и современных методов анализа для обеспечения надежности полученных результатов. Как известно, именно тканеспецифичность и вариабильность результатов в зависимости от типа культуры клеток является важной проблемой современного биохимического исследования. Поэтому детальный подход автора к решению этой проблемы заслуживает отдельного упоминания. Также важно отметить использование в работе ряда классических биохимических подходов для решения задач исследования, например, хроматографического разделения клеточных экстрактов для выделения и идентификации белков.

Глава «Результаты исследования» включает четыре раздела. Первый раздел посвящен исследованию механизма клеточной регуляции E3-убиквитинлигазы MULE, регулирующей уровень ДНК-полимеразы бета и, соответственно, эффективность репарации поврежденных оснований ДНК и ОЦР. Концентрация MULE оценена в различных условиях и установлено ее немедленное снижение в ответ на повреждения ДНК. Анализ этого процесса показал, что увеличение концентрации MULE приводит к замедлению репарации, а также к снижению эффективности p53-регулируемого ответа клетки на повреждения ДНК. Установлено, что уровень MULE регулируется как самоубиквитинированием, так и действием противоположного процесса, катализируемого убиквитин-специфической протеазой USP7S.

В следующем разделе проведены эксперименты по выявлению ферментных систем, вовлеченных в сигнализацию ОЦР – от сенсоров повреждений к MULE. Проведено исследование механизма регуляции USP7S и показано, что активность этого фермента снижается в ответ на повреждающий ДНК стресс. Выяснен механизм такого снижения: как оказалось, активность USP7S регулируется фосфорилированием серина 18, эффективность которого снижается при повреждениях ДНК. Показано синхронное с USP7S снижение по времени концентрации фермента HDM2, который, как и MULE, является убиквитин-лигазой p53. Для того чтобы выяснить, какой фермент катализирует фосфорилирование серина 18, было проведено фракционирование клеточного экстракта и установлено, что эту реакцию осуществляет казеин-киназа 2. Любопытно, что эта активность не зависит от повреждений ДНК. Автором также показана роль другого фермента – PPM1G-фосфатазы в

дефосфорилировании USP7S в ответ на повреждения ДНК. Далее установлено, что активация фосфатазы при повреждениях ДНК связана с фосфорилированием PPM1G киназой ATM. Данный результат является неожиданным, поскольку предполагает регуляцию активности ATM в ответ на ОЦР и повреждения оснований ДНК, в репарации которых участвует выявленная ферментативная цепь. Явление активации ATM было описано ранее только в ответ на ДЦР. В заключение этого раздела автором выдвинуто предположение, что активность ATM может регулироваться повреждениями оснований ДНК и ОЦР.

Следующий раздел посвящен доказательству этого предположения. Показано, что повреждения оснований ДНК не вызывают активацию ATM. Вместе с тем, нерепарированные ОЦР действительно приводят к активации киназы ATM в отсутствие ДЦР. Такое заключение основано на использовании нескольких независимых экспериментальных подходов. Установлена важность активации ATM в ответ на ОЦР. При этом показано, что p53-ответ клеток с нефункциональной ATM на повреждения ДНК нарушен, а репарация ОЦР и поврежденных оснований ДНК в таких клетках замедлена. Таким образом, удалось установить взаимосвязь описанного каскада ферментативных активностей с процессом активации ATM, индуцированной ОЦР. Также показано, что в отсутствие эффективной репарации ОЦР и p53-зависимого контроля перехода клеток из G₁- в S-фазу клеточного цикла в клетках с нефункциональной ATM наблюдается образование значительного количества репликационных ДЦР. Данный раздел диссертационной работы представляет значительный интерес для развития медицинских приложений, поскольку именно нарушения репарации ОЦР могут играть важную роль в нестабильности клеточного генома у пациентов с атаксией телеангиэктазией.

В заключительном разделе главы проведены предварительные исследования механизма активации ATM в ответ на ОЦР. В результате показано, что ОЦР-зависимая активация ATM не зависит от белковых факторов, необходимых для ДЦР-зависимой активации. С помощью кнРНК против PARP1 и ингибитора PARP1 показано, что активация ATM в ответ на ОЦР зависит от активности PARP1, что безусловно предстоит исследовать в дальнейшем.

В результате выполненного исследования автором была выявлена важная роль киназы ATM и ряда других ферментов в ответе клетки на ОЦР. Хороненковой С.В. предложен новый комплексный механизм клеточного ответа на ОЦР, обеспечивающий координированную регуляцию репарации ОЦР и контроля процессов протекания клеточного цикла

«Заключение» и «Выводы» отражают основные достижения работы. На основе полученных результатов автором предлагается разработка новых подходов, которые могут оказаться полезными для терапии онкозаболеваний.

По диссертационной работе имеется ряд замечаний:

1. Несмотря на развернутый анализ литературы, автором остались незамеченными некоторые важные публикации, непосредственно относящиеся к выполненной работе. Так, в работе, опубликованной в Nature Communications (Fang Q et al, 2014), показано, что белок XRCC1 защищает ДНК-полимеразу бета, с которой он образует прочный комплекс (Moor N et al, 2015, Nucleic Acids Res), от убиквитинилирования и последующей протеасомной деградации. XRCC1 является важнейшим сенсором ОЦР и ближайшим «партнером» ДНК-полимеразы бета в репарации оснований и одноцепочечных разрывов. В связи с упомянутыми работами представляет большой интерес сравнение данных, полученных в клетках с подавленным и нормальным уровнем экспрессии XRCC1.
2. Схема, приведенная на стр.71, рассматривает активацию ATM через возникновение повреждений ДНК за счет окислительного стресса и через образование одноцепочечных разрывов. В то же время одноцепочечные разрывы могут формироваться и при окислительном стрессе.
3. Работа не лишена стилистических погрешностей. Например: «Продемонстрировав, что PPM1G-зависимое снижение эффективности..., было решено выяснить...» (стр. 161), «Подчеркивая биологическое значение полученных результатов, нами было установлено... (стр. 171), «Суммируя, полученные экспериментальные данные свидетельствуют...» (стр. 182) и ряд других подобных выражений.
4. Автор оперирует в диссертационной работе терминами «стабильность» и «стабилизация» ферментов в различных контекстах и значениях, хотя в биохимии эти термины имеют вполне определенный смысл.
5. Как в тексте диссертации и автореферата, так и в списке сокращений отсутствует расшифровка сокращения ARF.

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на результаты и выводы данной работы. Диссертация Хороненковой С.В. является комплексным и всесторонним научным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Полученные результаты имеют важное фундаментальное значение для дальнейших исследований механизмов обеспечения

целостности клеточного генома и, в частности, клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК. Полученные результаты могут иметь практическое значение. Автореферат и научные статьи по теме диссертации полностью отражают содержание диссертационной работы.

По объему и качеству представленных данных, актуальности и научной новизне сделанных выводов, а также возможности практического использования полученных результатов диссертационная работа Хороненковой С.В. является законченным фундаментальным исследованием, и ее содержание соответствует специальности 03.01.04 – «биохимия». Совокупность теоретических и практических положений работы Хороненковой С.В. можно классифицировать как крупное научное достижение по выявлению молекулярных механизмов и ферментных систем клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК.

В заключение, диссертационная работа Хороненковой Светланы Владимировны под названием «Роль киназы АТМ в координации клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК каскадом посттрансляционных модификаций» в полной мере отвечает положениям Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 г, в редакции № 335 от 21.04.2016, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Хороненкова С.В., заслуживает присуждения степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

5 июня 2017 г.

Зав. лабораторией биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН:
член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор



Лаврик О.И.

Сведения об официальном оппоненте: Лаврик Ольга Ивановна, член-корреспондент РАН, профессор, доктор химических наук по специальности 02.00.10 - «биоорганическая химия», зав. лабораторией биоорганической химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).
Адрес: 630090 г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8, ИХБФМ СО РАН, www.niboch.nsc.ru
Тел. (383)363-51-95, E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Подпись Лаврик О.И. заверяю
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.х.н.



Пестряков П.Е.