

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Хороненковой Светланы Владимировны «Роль киназы ATM в координации клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК каскадом посттрансляционных модификаций», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук в диссертационный совет Д 501.001.59 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по специальности 03.01.04 – биохимия.

Стабильность генома является фундаментальной характеристикой любого живого организма, обеспечивающей сохранение и передачу генетического материала от поколения к поколению и от одной соматической клетки к другой. Одним из механизмов обеспечения стабильности генома является ответ клетки на повреждения ДНК, включающий их распознавание, сигнализацию и репарацию, а также обеспечивающий взаиморегуляцию других клеточных транзакций, зависящих от качества ДНК. Действие такой системы в здоровых клетках обеспечивает репарацию репликационных ошибок и спонтанно возникающих повреждений ДНК и необходимо для нормального функционирования клетки и организма в целом. Вместе с тем определенный уровень пластичности в эффективности безошибочной репарации ДНК совершенно необходим для процесса эволюционной изменчивости. В раковых клетках ответ на повреждения ДНК снижает эффективность радио- и фармакотерапии онкологических заболеваний. Помимо раковых заболеваний, нестабильность генома ассоциирована с клеточным старением, а в последние годы была установлена в качестве одной из важнейших причин развития целого ряда прогрессивных нейродегенеративных заболеваний. Таким образом, помимо очевидной фундаментальной важности исследований механизмов обеспечения стабильности генома, к которым относится диссертационная работа Хороненковой, данные исследования имеют несомненную практическую значимость.

Целью диссертационной работы Хороненковой С.В. являлось полномасштабное экспериментальное исследование механизмов ответа клетки на одноцепочечные разрывы ДНК (ОЦР), которые являются наиболее многочисленным типом спонтанных повреждений ДНК. Хочется отметить, что за годы исследования механизмов поддержания стабильности генома, было накоплено значительное количество информации о механизмах клеточного ответа на двуцепочечные разрывы ДНК (ДЦР), тогда как фундаментальная важность координированного ответа клетки на ОЦР до настоящего времени оценена не была. Как следствие, работа Хороненковой С.В. является уникальным комплексным исследованием молекулярных механизмов

клеточного ответа на ОЦР и последствий нарушения действия подобной системы в случае патогенеза.

Хороненковой С.В. сформулирована гипотеза существования системы клеточного ответа на ОЦР. Хороненкова С.В. поставила ряд задач по поиску экспериментальных доказательств существования данной системы и выявлению механизма модуляции эффективности системы репарации ОЦР в зависимости от концентрации повреждений ДНК. Она провела работу по поиску и анализу функции белков, участвующих в выполнении данной клеточной программы, по исследованию взаиморегуляции репарации ОЦР с другими клеточными процессами в ответ на генотоксический стресс. Наконец, она изучила биохимическую важность действия исследуемой системы для поддержания целостности генома в эукариотической клетке. Для реализации поставленных целей автором использовался внушительный набор современных экспериментальных методов и подходов, усовершенствованных для выполнения конкретных задач в рамках диссертационной работы.

Диссертационная работа Хороненковой С.В. построена по традиционной схеме. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов диссертации и их обсуждения, заключения, выводов и списка процитированной литературы. Диссертация изложена на 268 страницах и включает 83 рисунка и 10 таблиц. Список литературы содержит 633 источника. Основные результаты диссертации отражены в 15 научных статьях, большинство из которых имеет высокий индекс цитирования.

Во введении автор четко формулирует основную гипотезу работы, ее актуальность и место в современной науке, обсуждает цели и задачи исследования, научную новизну и значимость результатов для фундаментальной науки и практического применения. В данном разделе четко отражен авторский подход к формулированию и решению поставленных целей и задач.

Обзор литературы состоит из четырех частей и информирует читателя о причинах химической нестабильности ДНК и различных типах спонтанных и индуцируемых повреждений ДНК, плавно перетекая в обсуждение систем поддержания целостности генома и, в частности, имеющих принципиальное значение для диссертации механизмов репарации повреждений азотистых оснований ДНК, ОЦР и ДЦР. Третья часть обзора литературы посвящена обсуждению классической клеточной роли киназы АТМ в ответе на ДЦР и открытиях последних лет о неканонических механизмах стимуляции активности фермента в ответ на другие типы стресса. В данной части также обсуждаются фенотипы (и их причины) заболевания атаксия телеангиэктазия, обусловленного мутациями в кодирующем киназу гене АТМ. Наконец, в

заключительной части обзора литературы удачно суммированы скудные современные знания о регуляции эффективности процессов репарации оснований ДНК и ОЦР и обсуждаются предпосылки существования системы клеточного ответа на ОЦР. Обзор литературы изложен четко и логично структурирован, сопровождается качественным иллюстративным материалом и полностью информирует читателя о современном состоянии области исследования и актуальности поставленной в работе проблеме.

В описании материалов и методов суммируются модельные системы и внушительная методологическая база исследования. Используемые экспериментальные подходы представляют собой впечатляющий спектр классических методов, адаптированных для целей и задач исследования, а также наиболее современные методы биохимии, биофизики и генетической инженерии. Для иллюстрации многообразия и методической сложности использованных подходов хочется отметить использование бакуловирус-инфицированных клеток насекомых для производства рекомбинантных белков, иммунофлуоресцентный анализ и конфокальную микроскопию и многостадийное хроматографическое фракционирование клеточных экстрактов с целью выделения активностей, ответственных за специфические посттрансляционные модификации субстратов.

В описании результатов автором сначала исследуется механизм регуляции уровня E3-убиквитинлигазы MULE. Данный фермент, как было показано ранее в соавторстве с Хороненковой С.В., контролирует уровень ДНК-полимеразы β и p53 и, соответственно, эффективность систем репарации ОЦР и повреждений оснований ДНК в ответ на генотоксический стресс (ГС). Показано, что уровень MULE снижается после обработки клеток химическими агентами, вызывающими повреждения ДНК. В элегантном эксперименте, использующем суперэкспрессию MULE, показано, что ГС-регулируемое снижение уровня фермента необходимо для стимуляции эффективной репарации ДНК. На данном этапе автор задает вопрос о механизме регуляции подобного эффекта.

В следующей части установлено, что уровень MULE регулируется системой убиквитинилирования, в частности, процессами самоубиквитинилирования и противостоящего деубиквитинилирования ферментом USP7S. Выяснен механизм регуляции USP7S в неповрежденных клетках и в ответ на ГС. Оказалось, что стабильность и активность USP7S напрямую зависят от уровня фосфорилирования данного фермента по остатку S18. С использованием набора изящных биохимических экспериментов было выявлено, что фосфорилирование USP7S по S18 осуществляется казеинкиназой CK2, и что уровень фосфорилированного USP7S составляет около 70% в неповрежденных клетках человека. Было также показано, что в ответ на ГС

количество фосфорилированного USP7S снижается, что необходимо для GC-зависимой дестабилизации MULE. При дальнейшем выяснении механизма регуляции эффективности репарации ОЦР и повреждений оснований ДНК автором выявлена фосфатаза PPM1G, которая дефосфорилирует S18 в USP7S. Причем показано, что активность PPM1G повышается в ответ на GC, и что в отсутствие PPM1G не наблюдается GC-зависимого снижения фосфорилирования USP7S и стабильности MULE. Наконец, показано, что активность PPM1G стимулируется в ответ на GC-зависимое фосфорилирование данного фермента киназой ATM. Таким образом, автор очертил механизм регуляции эффективности репарации ОЦР и повреждений оснований ДНК и выявил основные белки, вовлеченные в данный процесс.

Хочется отметить, что для доказательства достоверности результатов и их независимости от типа используемых клеток во всех основных экспериментах диссертант использовал широкий ряд независимых экспериментальных подходов, а также набор нормальных и раковых клеточных линий человека. Также хочется отметить умелое, напоминающее детективную историю, описание результатов в данной, очень сложной, части работы (и позже при обсуждении результатов). Демонстрация GC-зависимой регуляции MULE неизбежно поднимает вопрос о регуляции уровня USP7S, а данные о роли фосфорилирования S18 в белке USP7S в регуляции стабильности и активности фермента стимулируют поиск киназы и фосфатазы для USP7S и оценки их активности в ответ на GC.

В результате, полученные на данном этапе работы данные, позволили диссертанту сделать принципиально важный вывод о центральной роли киназы ATM в регуляции эффективности репарации ОЦР и повреждений оснований ДНК, а также предложить принципиально новую гипотезу о возможной роли ATM в ответе клетки на данные типы повреждений ДНК.

Новизна такой гипотезы связана с тем, что ATM является признанным регулятором клеточного ответа, специфическим для ДЦР. Сигналом к запуску подобного ответа является стимуляция активности ATM в ответ на распознавание ДЦР комплексом MRN, включающим белки MRE11, RAD50 и NBS1. Соответственно, предложенная диссертантом гипотеза об ОЦР-зависимой стимуляции активности ATM, предполагает либо узнавание ОЦР комплексом MRN, либо существование ДЦР- и MRN-независимого механизма активации киназы. Оба предположения являются принципиально новыми и чрезвычайно интересными.

Следуя высказанным предположениям, автор посвятил следующую часть раздела исследованию факта стимуляции киназной активности ATM. В первую очередь было показано, что активация ATM происходит при обработке нормальных клеток человека агентами, вызывающими образование

алкилированных оснований ДНК или значительной части ОЦР (с небольшим числом ДЦР). Интересно, что блокирование процессирования алкилированных оснований ДНК с образованием ОЦР в процессе их репарации, также блокировало активацию АТМ. Автором был сделан важный обоснованный вывод, что стимулятором активности АТМ являются ОЦР, а не повреждения оснований ДНК.

Оставшаяся часть данного подраздела посвящена экспериментальным доказательствам того, что ОЦР-зависимая активация АТМ происходит в отсутствие ДЦР, и также исследованию важности подобной активации. Для решения первой задачи диссертант использовал целый ряд остроумных экспериментальных подходов, включая использование синхронизированных в фазе G1 культур клеток с анализом активации АТМ в индивидуальных клетках методами иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии, модификации метода ДНК-Комет и анализ распределения популяций клеток с активной АТМ по фазам клеточного цикла методами проточной цитометрии.

При решении второй задачи было выявлено, что ОЦР-активация АТМ необходима для предотвращения репликации клеток с поврежденной ДНК в соответствии с p53-зависимым механизмом. Использование клеток, полученных из пациентов с заболеванием атаксия телеангиэктазия, позволило показать в них отсутствие подобного чекпойнта. С использованием двух независимых подходов диссертант также показал, что в отсутствие АТМ происходит репликация клеток с ОЦР и образование репликационных ДЦР. Для объединения результатов данной части с предыдущей частью работы диссертант показал, что кинетика репарации ОЦР в отсутствие АТМ значительно замедлена. Таким образом, был сделан вывод, что в присутствии ОЦР стимулируется киназная активность АТМ, которая запускает многоступенчатый АТМ-зависимый ответ клеток на ОЦР. Данный ответ включает последовательную регуляцию целого ряда ферментов (PPM1G, CK2, USP7S, MULE, ДНК-полимеразы β и p53) и необходим для взаиморегуляции клеточного цикла и репарации ОЦР. Данный вывод является основополагающим и его достоверность, научная новизна и значимость не вызывают сомнений.

В заключительной краткой части автором приведены предварительные экспериментальные доказательства независимости ОЦР-активации АТМ от присутствия белков комплекса MRN. Также показано, что ОЦР-активация АТМ зависит от активности классического сенсора ОЦР PARP1. Хотя в работе и рассматриваются возможные механизмы PARP1-зависимой активации АТМ, его детальных исследований не приведено, что диссертант обосновывает текущими и будущими исследованиями.

Несмотря на глубину и очень высокое качество исследования, имеется ряд незначительных замечаний. Например, автор использует синхронизированные культуры клеток и другие методы для исключения репликационных ДЦР в стимуляции активности АТМ, но не обсуждает, возможен ли вклад образующихся в процессе транскрипции ДЦР в процесс активации этой киназы. В работе также присутствует незначительное количество опечаток и заимствованных из иностранных языков выражений, которые имеют общепринятые русскоязычные эквиваленты (например, прогрессия клеточного цикла). Данные замечания не носят принципиального характера и никоим образом не умаляют высокого качества работы.

В заключение, диссертационная работа Хороненковой С.В. является высококачественным и принципиально новым научным исследованием, которое имеет фундаментальное значение для развития области исследованием механизмов поддержания стабильности генома. В поддержку данного утверждения говорят данные о публикации работ Хороненковой С.В. в ведущих журналах области, включающих *Molecular Cell*, *PNAS*, *Nucleic Acids Research* (импакт-факторы 14,0, 9,4 и 9,2, соответственно). Важно подчеркнуть, что в данных работах она является первым автором. Всего автором опубликовано 15 работ по теме диссертации. О научной значимости работ говорит то, что ряд основополагающих работ в которых Хороненкова С.В. является первым автором, был высоко оценен мировым научным сообществом. На это указывает цитирование данных работ в мировой научной литературе: например, 77 цитирований работы в *Mol Cell* (2012) и уже 18 цитат работы в *PNAS*, которая была опубликована лишь недавно (2015). Результаты работы были также представлены диссертантом в виде докладов на международных конференциях и симпозиумах (всего 10 конференций, из них 5 приглашенных докладчиком).

Полученные Хороненковой С.В. результаты также имеют важнейшее значение для практики, поскольку закладывают научную базу для разработки лекарственных препаратов для терапии онкологических и, возможно, прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний. Действительно, в одной из публикаций Хороненковой С.В. с соавторами (*Chem Biol*, 2011) проводится разработка ингибитора USP7 для дальнейшего использования в качестве антиракового препарата. Возможно, в результате проведенных диссертантом исследований фокус ингибирования USP7 сместится на специфическую изоформу USP7S, удачно охарактеризованную Хороненковой С.В. как основную в плане активности изоформу USP7.

На основании изложенного выше считаю, что диссертационная работа Хороненковой Светланы Владимировны «Роль киназы АТМ в координации клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК каскадом

посттрансляционных модификаций», без сомнения является высококачественной научно-квалификационной работой, в которой разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое научное достижение в области биохимических исследований механизмов поддержания целостности генома. Данная работа полностью удовлетворяет требованиям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 и его редакции от 21 апреля 2016 года № 335, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Хороненкова Светлана Владимировна, несомненно заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией транскрипционных факторов эукариот
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук
член-корреспондент РАН, д.б.н., профессор

 Георгиева София Георгиевна

Подпись С.Г. Георгиевой заверяю

06.06.2017

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5,
тел. 7(499) 135-97-31,
электронная почта: sonjag@molbiol.edu.ru

