



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

24.05.17 № 143-217.1-414

на № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ
Врио Директора Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН,
академик РАН, профессор
А.Г. Табибов

ОТЗЫВ

ведущей организации, Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», 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 по специальности 03.01.04 – биохимия

Исследование механизмов поддержания целостности генома является одним из важнейших направлений современной биохимии. За пионерские работы в данной области в 2015 году Т. Линдал, П. Модрич и А. Санкар были удостоены Нобелевской премии по химии, а С. Элледж и Э. Уиткин были награждены престижной премией Ласкера в области медицины. Фундаментальная важность подобных исследований связана с тем, что нарушения целостности генома являются одной из ключевых причин развития онкологических и нейродегенеративных заболеваний, а также клеточного старения. С другой стороны, механистические исследования клеточных программ поддержания целостности генома имеют важнейшее практическое значение для разработки методов предупреждения, диагностики и лечения раковых и нейродегенеративных состояний, а также улучшения качества жизни населения.

Несмотря на значительные достижения последних лет в исследовании процессов репарации повреждений ДНК различных типов, механизмы систем координированного ответа клетки на нерепарированные повреждения ДНК, обеспечивающие их детектирование, сигнализацию и лишь затем репарацию, далеки от понимания. Это особенно важно в случае однонитевых разрывов ДНК, которые возникают благодаря нестабильности ДНК и при действии ряда клеточных процессов, представляют собой наиболее многочисленный тип эндогенных повреждений ДНК и имеют высокую цитотоксичность. В отличие от двунитевых разрывов ДНК, системы клеточного ответа на образование которых активно изучались в последние несколько лет, исследования систем клеточного ответа на однонитевые разрывы ДНК в настоящий момент ограничены изучением механизмов их детектирования и репарации. Соответственно, диссертационная работа Хороненковой С.В., посвященная формированию концепции существования системы координированного клеточного ответа на нерепарированные однонитевые разрывы ДНК, выявлению вовлеченных ферментных каскадов и детальному исследованию молекулярных механизмов реализации данной системы обладает несомненной актуальностью.

Диссертационная работа Хороненковой С.В. базируется на сделанном с ее участием в лаборатории профессора Дианова Г.Л. открытии о регуляции эффективности системы эксцизионной репарации оснований, ответственной за репарацию большинства эндогенных повреждений ДНК, включая однонитевые разрывы ДНК с каноническими 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной группами, в зависимости от эффективного количества нерепарированных повреждений ДНК. Подобная регуляция осуществляется через контроль ядерной концентрации ДНК-полимеразы β , которая является лимитирующим фактором образования репарационного белкового комплекса, системой убиквитинилирования с участием E3-убиквитинлигаз MULE и CHIP и убиквитин-специфической протеазы USP47. Как следствие, Хороненковой С.В. было высказано предположение, что, поскольку эффективный уровень содержания однонитевых разрывов ДНК в клетке постоянно меняется, должен существовать клеточный механизм передачи сигнала от данного типа повреждений ДНК к ферментам, ответственным за их репарацию. Соответственно, в диссертационной работе были поставлены фундаментальные задачи:

- 1) выявления ферментных сигнальных систем, участвующих в детекции и сигнализации нерепарированных однонитевых разрывов ДНК,
- 2) исследования механизмов координации сигнализации нерепарированных однонитевых разрывов ДНК с их репарацией и
- 3) изучения биохимической значимости системы клеточного ответа на однонитевые разрывы ДНК и последствий для клетки в случае отсутствия или неверного функционирования подобной системы.

В процессе решения поставленных задач Хороненковой С.В. был открыт многоступенчатый сигнальный каскад, обеспечивающий координацию эффективной репарации однонитевых разрывов ДНК с другими клеточными процессами, в частности, регуляцией клеточного цикла. Данный каскад регулируется посттрансляционными модификациями, включающими (де)фосфорилирование и (де)убиквитинилирование целого ряда ферментов, и совершенно необходим для поддержания целостности генома. Данный каскад является первым примером системы клеточного ответа на однонитевые повреждения ДНК и имеет несомненное концептуальное и фундаментальное значение для исследователей, работающих в областях исследования механизмов поддержания целостности генома, репарации повреждений ДНК и онкологии. Оригинальные исследования Хороненковой С.В. имеют существенную практическую ценность, поскольку они закладывают основу для разработки новых подходов к ингибированию ферментов системы клеточного ответа на однонитевые разрывы ДНК и открывают возможность для решения ряда практических вопросов в области лечения раковых заболеваний.

Более подробно Хороненковой С.В. было показано, что клеточная концентрация E3-убиквитинлигазы MULE кратковременно снижается после обработки клеток различными повреждающими ДНК агентами. Было установлено, что подобное снижение концентрации E3-убиквитинлигазы MULE в ответ на повреждения ДНК необходимо для 1) повышения концентрации ДНК-полимеразы β , что обеспечивает повышение эффективности репарации повреждений ДНК, и 2) стабилизации опухолевого супрессора p53, который является традиционным клеточным регулятором программ задержки клеточного цикла или апоптоза в зависимости от качества ДНК. Для выяснения молекулярного механизма отрицательной регуляции концентрации MULE в зависимости от количества повреждений ДНК и вовлеченных в данный процесс ферментов Хороненковой С.В. было проведено исследование механизма регуляции стационарной клеточной концентрации E3-убиквитинлигазы MULE. В диссертации было показано, что описанному ранее процессу самоубиквитинилирования MULE противостоит процесс деубиквитинилирования данного фермента изоформой USP7S убиквитин-специфической протеазы USP7, то есть уровень стационарной клеточной концентрации MULE регулируется через процесс деградации протеасомой 26S. При дальнейшем исследовании данной системы Хороненковой С.В. было показано, что снижение концентрации MULE в ответ на повреждения ДНК обусловлено кратковременным снижением концентрации убиквитин-специфической протеазы USP7S. При выяснении механизма регуляции USP7S было установлено, что 1) содержание изоформы USP7S среди других форм убиквитин-специфической протеазы USP7 не высоко (порядка 7%), но именно данная изоформа является убиквитин-специфической протеазой по отношению к MULE и другой E3-убиквитинлигазе HDM2, которая также регулирует клеточную концентрацию p53 и была

описана в качестве субстрата USP7 ранее, 2) порядка 70% изоформы USP7S фосфорилировано по остатку Ser18 в неповрежденных клетках, 3) фосфорилирование USP7S по остатку Ser18 регулирует время полужизни (стабильность) и активность фермента. На основании полученных данных Хороненковой С.В. было высказано логичное предположение, что снижение концентрации USP7S в ответ на повреждения ДНК может регулироваться путем изменения уровня фосфорилирования фермента по Ser18. Данное предположение оказалось верным и было подтверждено экспериментально. При использовании классического биохимического подхода по фракционированию цельного клеточного экстракта с последующим поиском фракций, проявляющих определенную ферментативную активность, Хороненковой С.В. были выявлены киназа CK2 и фосфатаза PPM1G, обеспечивающие регуляцию количества фосфорилированной по Ser18 формы USP7S. В ходе дальнейших экспериментов было установлено, что тогда как фосфорилирование USP7S киназой CK2 не регулируется в зависимости от количества повреждений ДНК, фосфатазная активность PPM1G стимулируется в ответ на обработку клеток повреждающими ДНК агентами. Именно за счет усиленного дефосфорилирования USP7S фосфатазой PPM1G наблюдается снижение концентрации и активности USP7S в ответ на повреждения ДНК с соответствующим снижением концентраций E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2. Наконец, было показано, что активность PPM1G регулируется фосфорилированием данного фермента киназой ATM в ответ на повреждения ДНК. Таким образом, было установлено, что киназа ATM регулирует эффективность системы эксцизионной репарации оснований через многоферментный сигнальный путь с участием фосфатазы PPM1G и киназы CK2, убиквитин-специфической протеазы USP7S, E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2, ДНК-полимеразы β и опухолевого супрессора p53.

До диссертационной работы Хороненковой С.В. киназа ATM рассматривалась в качестве классического белка-преобразователя в рамках клеточного ответа на двунитевые разрывы ДНК. После связывания белкового комплекса Mre11-Rad50-Nbs1 с двунитевым разрывом ДНК происходит стимуляция киназной активности ATM с последующим фосфорилированием данной киназой нескольких сотен субстратов, что обеспечивает координированную регуляцию целого ряда процессов, включая прогрессию клеточного цикла или апоптоз, репарацию двунитевых разрывов ДНК и необходимое для нее ремоделирование структуры хроматина, транскрипцию и сплайсинг и многие другие. В диссертации Хороненковой С.В. было установлено, что активность киназы ATM также стимулируется нерепарированными одонитевыми разрывами ДНК в отсутствие двунитевых разрывов ДНК и независимо от присутствия комплекса Mre11-Rad50-Nbs1. При исследовании возможного механизма данного процесса было показано, что активация ATM одонитевыми разрывами ДНК зависит от активности классического сенсора данного типа повреждений ДНК поли-

(АДФ-рибозо)-полимеразы PARP1. Полученные результаты оспаривают сложившиеся в научном сообществе представления о функции киназы АТМ в детекции лишь двунитевых разрывов ДНК и являются новейшим и указывают на значительно более широкую роль данного фермента в качестве сенсора клеточного гомеостаза с точки зрения качества ДНК. Описанные Хороненковой С.В. концепции и результаты обладают несомненной научной новизной и имеют огромную важность для фундаментальных исследователей, а также практическую ценность для работников медицины, поскольку существенно расширяют наше понимание фенотипа генетической нестабильности, характерного для заболевания атаксия телеангиэктазия, связанного с мутациями потери функции в гене *АТМ*, а также ряда раковых патологий.

Исследования Хороненковой С.В. имеют высокую актуальность и высоко оценены международным научным сообществом, что следует из значительного числа цитирований ее работ в публикациях других ученых и приглашений в качестве докладчика для выступлений на международных симпозиумах и конференциях.

Диссертационная работа Хороненковой С.В. имеет традиционное построение и включает Введение, четыре главы (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и Обсуждение результатов), Заключение, Выводы и Список литературы. Диссертационная работа изложена на 268 страницах, включает 10 таблиц и 83 рисунка. Список литературы диссертации включает 633 наименования, причем значительное количество работ из Списка литературы опубликовано в последние 2-3 года.

В Обзоре литературы, состоящем из четырех подразделов, рассматриваются причины химической нестабильности ДНК и широкое многообразие различных типов повреждений ДНК (их источники, частота встречаемости и относительная цитотоксичность). Кратко описаны общие механизмы поддержания целостности клеточного генома и более подробно основные системы репарации поврежденных оснований, одно- и двунитевые разрывы ДНК, которые имеют значение в рамках полученных Хороненковой С.В. результатов. В третьем подразделе описаны клеточная функция и известные механизмы активации киназы АТМ двунитевыми разрывами ДНК и в ответ на окислительный стресс. Критически обсуждаются возможные альтернативные механизмы активации АТМ и новейшие данные по исследованию фенотипов заболевания атаксия телеангиэктазия, вызванного мутациями в гене *АТМ*. В заключение, обсуждаются предпосылки и назревшая необходимость по изучению систем клеточного ответа на однонитевые разрывы ДНК. Обзор литературы хорошо написан, имеет логичное построение и дает полное представление о современных догмах и вопросах, требующих решения, в областях поддержания целостности генома и репарации ДНК. Обзор литературы содержит сбалансированное количество критической авторской оценки

проведенных другими исследованиями и логично подводит читателя к основным целям и задачам диссертационного исследования Хороненковой С.В.

В Материалах и методах обсуждается широкий ряд современных биохимических и биофизических методов, методов молекулярной и клеточной биологии, а также многочисленных материалов, использованных в работе. Для решения поставленных задач в диссертации использованы передовые экспериментальные подходы и методы, которые говорят о значительном объеме проведенных исследований и высочайшей квалификации диссертанта.

В двух последующих главах, Результаты и Обсуждение результатов, описываются основные экспериментальные достижения диссертации по исследованию механизмов регуляции клеточных уровней содержания E3-убиквитинлигазы MULE и изоформы убиквитин-специфической протеазы USP7S, стимуляции киназной активности ATM одностранными разрывами ДНК и возможными механизмами подобной активации. Как обсуждается выше, полученные результаты описывают единый механизм передачи сигнала от одностранных разрывов ДНК к ферментам их репарации и другим клеточным системам, участвующим в координации репарации и регуляции клеточного цикла. Все экспериментальные результаты проиллюстрированы соответствующими рисунками и выполнены на высоком экспериментальном уровне с включением адекватных и неоспоримых контролей и современных методов статистической обработки. В Обсуждении результатов проводится детальный и критический анализ полученных данных в сравнении с результатами других исследователей и с общим направлением развития области. Хочется отметить, что ряд результатов Хороненковой С.В. был воспроизведен другими зарубежными и отечественными учеными, а в некоторых случаях послужил опорной точкой для новых направлений исследований, что подтверждает достоверность и новизну проведенных исследований.

Наконец, в Заключение формулируется вклад сделанных открытий в расширенное понимание фундаментальных механизмов поддержания целостности генома путем координации репарации одностранных разрывов ДНК, которые являются наиболее часто встречающимся эндогенным типом повреждений ДНК, обладающим цитотоксичностью. Обсуждается, что подобный механизм является свойством непатогенной клетки, предотвращающим нежелательное патогенетическое перерождение. С другой стороны, приводится конкретный пример патологического нарушения действия предложенной системы клеточного ответа на одностранные разрывы ДНК, характерный для индивидуумов с мутациями в гене киназы *ATM*, страдающих наследственным синдромом Луи-Бара. В данном случае сделанные Хороненковой С.В. открытия расширяют наше понимание плеотропных фенотипов данного заболевания и создают базу для разработки новых терапевтических подходов к улучшению качества жизни пациентов. В более общем случае полученные

результаты применимы к целому ряду других патологий, к которым относятся раковые заболевания с мутациями в описываемых Хороненковой С.В. белках, потенциально целый ряд нейродегенеративных заболеваний, связанных с некорректной репарацией однонитевых разрывов ДНК и преждевременное старение клеток.

Несмотря на то, что полученные в диссертации результаты описаны обстоятельно и логично, при прочтении диссертации возникли следующие пожелания:

- В работе обсуждается как некорректная репарация однонитевых разрывов может влиять на развитие онкологических заболеваний и многосистемного синдрома Луи-Бара, но вопрос о потенциальной важности открытой автором системы клеточного ответа в предотвращении заболеваний нервной системы затрагивается лишь поверхностно.

- автор лишь вскользь упоминает о существовании родственных АТМ киназ DNA-РКс и АТР и практически не затрагивает вопрос о возможной активации данных киназ однонитевыми разрывами ДНК как это было продемонстрировано в случае АТР. Подобные данные или рассуждения, по нашему мнению, могли бы несколько усилить общее положительное впечатление от работы.

Отмеченные моменты являются скорее пожеланиями и никоим образом не влияют на выводы и не снижают научную ценность диссертации и положительную оценку работы, которая выполнена на самом высоком профессиональном уровне и несомненно окажет (и уже оказывает) значительное влияние на развитие области исследований механизмов поддержания целостности генома.

По теме диссертации Хороненковой С.В. опубликовано 15 научных статей в журналах, входящих в перечень ведущих научных журналов ВАК РФ и имеющих высокий импакт-фактор и уровень цитирования, и 10 тезисов докладов на международных научных конференциях и симпозиумах. Особо следует отметить очень высокий уровень публикаций в таких ведущих высокоцитируемых журналах как EMBO Journal, Molecular Cell, Cell Cycle, Nucleic Acids Resesearch, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. с импакт фактором 9 и выше. Содержание диссертации достаточно полно отражено в автореферате и публикациях.

С учетом объема и качества проведенных исследований, актуальности, высокой научной и практической новизны диссертационная работа Хороненковой С.В. является завершенным научно-квалификационным исследованием, совокупность теоретических положений которого можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области исследования механизмов клеточного ответа на однонитевые разрывы ДНК. Таким образом, диссертация полностью отвечает требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, описанным в пунктах 9-14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 №842 с изменениями от 21.04.2016

№ 335. Автор диссертации, Хороненкова Светлана Владимировна, безусловно заслуживает присвоения ей искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Полученные автором результаты могут быть использованы рядом научных институтов и лабораторий, а также медицинских центров, ведущих исследования в областях поддержания целостности генома человека, репарации ДНК и разработку подходов к терапии наследственных и онкологических заболеваний – в Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта РАН, Институте биологии гена РАН, Институте молекулярной генетики РАН, НИЦ «Курчатовский институт», Институте химической биологии и фундаментальной медицины и Институте цитологии и генетики СО РАН, онкологический научном центре имени Н.Н.Блохина Минздрава России, Институте цитологии РАН, научно-исследовательском институте физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, Химическом, Биологическом факультетах и Факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова.

Отзыв на диссертационную работу Хороненковой Светланы Владимировны подготовлен д.х.н., Петренко Александром Георгиевичем, обсужден и утвержден на межлабораторном научном семинаре Отдела пептидно-белковых технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

27 апреля 2017 г., протокол № 9.

Заведующий лабораторией клеточной биологии рецепторов
доктор химических наук



А.Г. Петренко

Подпись Петренко А.Г. заверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН д.ф.-м.наук



В.А.Олейников

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФГБУН ИБХ РАН)

Лаборатория клеточной биологии рецепторов,

тел. +7 (495) 335-41-77,
email: petrenkoag@gmail.com.