

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента**

**на диссертационную работу Кучура Олега Александровича  
«Механизмы усиления гибели p53-положительных опухолевых клеток  
при комбинировании ионизирующего излучения и ингибиторов  
CDK8/19-зависимого перепрограммирования транскрипции»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических  
наук по специальности 1.5.4 – Биохимия**

### **Актуальность диссертационной темы**

Клеточный стресс запускает перепрограммирование транскрипции, необходимое для поддержания гомеостаза в стрессовых условиях. Стресс-индуцированные изменения транскрипции включают индукцию цитопротекторных генов и репрессию генов, связанных с регуляцией клеточного цикла, транскрипции и метаболизма. Чтобы активировать стресс-специфические транскрипционные программы, в клетках используются чувствительные к стрессу транскрипционные факторы (в частности, фактор теплового шока 1 - HSF1, ядерный эритроидный фактор 2 - Nrf2, ядерный фактор каппа В - Nf-κB, регулирующие транскрипцию генов при тепловом и оксидативном стрессе). Кроме того, состояние транскрипции регулируется динамическими изменениями модификаций гистонов и организации хроматина, хотя эти процессы все еще плохо изучены в контексте стресса.

Важную роль в перепрограммировании транскрипции играют циклинзависимые киназы CDK8/19 (CDK19 - пролог CDK8), функционирующие в контакте белками (CCNC, MED12), которые активируют функцию киназ CDK8/19, и белком MED13, что делает возможным их ассоциацию с медиаторным комплексом - необходимым коактиватором транскрипции, связывающем действие факторов транскрипции и РНК-полимеразы II. CDK8/19 фосфорилируют ряд факторов транскрипции (STAT1,

HIF1A, SREBP), которые могут модулировать функцию других факторов транскрипции.

Транскрипционный фактор и опухолевый супрессор p53 активируется при накоплении повреждений ДНК. В результате активации p53 происходит остановка клеточного цикла и репликации ДНК; при сильном стрессовом сигнале — запуск апоптоза. Действие ионизирующей радиации на клетки, вызывая одно- или двухцепочечные разрывы ДНК в результате активации свободнорадикальных процессов, приводит к активации p53, который может стимулировать апоптоз через индукцию проапоптотических (Bax) и репрессию антиапоптотических (Bcl-2) белков, а также вызывать активацию или ингибирование таргетных генов, участвующих в регуляции клеточного цикла. Однако остается непонятным является ли индукция p53 при облучении перепрограммируемым процессом и можно ли повысить эффективность воздействия ингибированием перепрограммирования транскрипции. Задавая такой вопрос и опираясь на тот факт, что помимо основной функции в качестве фактора перепрограммирования транскрипции, CDK8/19 могут быть задействованы в различных ответах на клеточный стресс и повреждения ДНК, а также учитывая, что их роль при облучении и активации p53-ассоциированных факторов изучена недостаточно, Кучур Олег Александрович определяет цель и формулирует задачи своей работы. Учитывая новизну и важность исследования механизмов клеточного перепрограммирования при стрессовых воздействиях, тему диссертационной работы Кучура О.А. «Механизмы усиления гибели p53-положительных опухолевых клеток при комбинировании ионизирующего излучения и ингибиторов CDK8/19-зависимого перепрограммирования транскрипции» несомненно следует рассматривать как актуальную и важную для развития как фундаментальных представлений о механизмах перепрограммирования, так и практических подходов в регуляции гибели опухолевых клеток.

## **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.**

Диссертационная работа Кучура О.А. представляет собой научное исследование, соответствующее требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Все главы взаимосвязаны и логически последовательны.

Во введении автор убедительно обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цели и задачи, которые отражают логику исследования и полностью реализованы в содержании работы.

В первой главе автор подробно анализирует литературные данные, касающиеся рассматриваемых в диссертационной работе вопросов, в том числе механизмы действия ионизирующего излучения, общие ответы клетки на терапевтическое ионизирующее излучение; характеристика структуры, функции и роли онкосупрессора p53 при действии ионизирующего излучения. Подробно автор останавливается на анализе радиорезистентности, опосредованной белками семейства p53, и путях её преодоления. Обзор достаточно широко охватывает сведения по изучаемым вопросам и вводит читателя в круг исследуемых автором проблем, делая работу логично сформулированной.

В главе «Материалы и методы исследования» детально описаны методы, которые адекватны поставленным задачам и цели диссертационного исследования. Кучуром О.А. применен широкий и разносторонний набор современных методических приемов, что говорит о его высокой методической подготовленности. В работе использованы: метод проточной цитометрии для оценки фаз клеточного цикла, клоногенный анализ, оценка цитотоксичности (МТТ-тест), ПЦР с обратной транскрипцией, ПЦР в режиме реального времени, вестерн-блоттинг, цитохимический метод определения активности  $\beta$ -галактозидазы. Действие рентгеновского излучения оценивалось на линиях

опухолевых клеток с диким типом *TP53*, делецией обоих аллелей гена *TP53*<sup>-/-</sup> и с инактивированным (технология CRISPR/Cas9) геном *CDK8*<sup>-/-</sup>. Полученные результаты обработаны с помощью адекватных методов статистического анализа.

В главе «Результаты исследования» подробно изложены и обсуждаются данные, касающиеся сравнительной оценки выживаемости и изменения клеточного цикла клеток аденокарциномы толстой кишки НСТ116 и НСТ116p53КО с делецией гена *TP53*<sup>-/-</sup> при действии рентгеновского излучения, оценки экспрессии p53-ассоциированных генов в зависимости от дозы облучения и статуса p53; исследования выживаемости (с использованием МТТ и клоногенного анализа), клеточного цикла и индукции старения опухолевых клеток и экспрессии p53-ассоциированных генов при действии комбинации облучения с ингибированием циклинзависимых киназ CDK8/19; оценки влияния облучения и ингибитора CDK8/19 на индукцию белков, регулирующих p53; исследования взаимосвязи транскрипционного фактора NFκB и экспрессии p53 с ингибированием CDK8/19.

Кучур О.А. убедительно демонстрирует высокую чувствительность клеток НСТ116p53КО с делецией гена *TP53*<sup>-/-</sup>, в отличие от клеток НСТ116, к действию рентгеновского излучения, выдвигая предположение, что данный эффект можно объяснить p53-зависимой активацией белка-ингибитора циклин-зависимой киназы 1A - p21 в ответ на облучение и повреждение ДНК с последующей остановкой клеточного цикла на границах G1/S и G2/M и возможностью репарации ДНК, тогда как в клетках с функционально неактивным p53 такой блок клеточного цикла отсутствует, что приводит к усилению клеточной гибели.

Для подтверждения такого предположения автор успешно проводит оценку экспрессии p53-ассоциированных генов в зависимости от дозы облучения и статуса p53, показывая похожий характер активации экспрессии генов *TP53* и *CDKN1A*, кодирующего белок p21, в клетках НСТ116 после действия радиации в отличие от сублинии с нефункционирующим p53, где

экспрессия гена *CDKN1A* весьма слабо отвечала на облучение. Аналогичное изменение экспрессии в ответ на радиационное действие (краткосрочные и долгосрочные эффекты) установлено для других генов, контролируемых транскрипционным фактором p53, в частности генов проапоптотических белков семейства Bcl-2 Puma и Noxa. Однако активация экспрессии гена *NOXA* оказалась слабо выраженной.

Данные вестерн-блоттинга в значительной степени подтверждают результаты ПЦР об характере изменения экспрессии генов транскрипционного фактора p53 и контролируемых им генов при действии рентгеновского излучения.

Следует отметить (в качестве замечания), что при оценке изменения уровня белков (p53, p21, Puma, Noxa и др.) с использованием вестерн-блоттинга Кучур О.А. ссылается на данные денситометрии (с. 58, 76) однако эти результаты в диссертации и автореферате не представлены, что обедняет иллюстративность такого уровня исследования.

С помощью МТТ-тестов и световой микроскопии автором оценена выживаемость и морфологические изменения в клетках после облучения дозами до 10 Гр в комбинации с селективным блокатором циклинзависимых киназ CDK8/19 - сенексином Б. Важным качеством сенексина Б для использования как в данном исследовании, так и для дальнейших работ в этой области было обнаружение полного отсутствия (при концентрации 1 мкМ) его цитостатических и цитотоксических эффектов независимо от статуса p53.

В ходе исследования обнаружено, что, если при облучении без добавления ингибитора CDK8/19 максимальная степень гибели отмечается у клеток с инактивированным p53, то при комбинации указанных воздействий более выражена гибель клеток с интактным p53. Ингибитор не только эффективнее запускает гибель клеток при комбинации с облучением (по сравнению с облучением без сенексина Б), но и препятствует задержке в G2/M фазе, не позволяя клеткам «избегать» апоптоза посредством остановки клеточного цикла с последующей репарацией. Этот факт позволяет автору

предполагать наличие CDK8/19-зависимого механизма регуляции выживаемости/гибели в клетках с интактным p53.

Показывая, что сенексин Б в комбинации с облучением снижает колониюобразование клетками НСТ116 относительно облучения без ингибитора CDK8/19, автор утверждает, что в клетках НСТ116p53КО сенексин Б не усиливает лучевое воздействие. Однако, судя по данным (рис.26 диссертации), это не совсем верно; было бы корректнее говорить, что сенексин Б усиливает лучевое воздействие на клетки НСТ116p53КО в дозе 2 Гр, но в заметно меньшей степени, чем на клетки с интактным p53, и не усиливает лучевое воздействие в дозе 4 Гр. Кучур О.А. также демонстрирует результаты, показывающие, что действие сенексина Б вызывает снижение процесса клеточного старения (сенесенса), вызываемого рентгеновским излучением, в большей степени у клеток с интактным p53.

Следует подчеркнуть, что полученные данные свидетельствуют о значимой роли p53-зависимых процессов для выживаемости и восстановления клеток, подвергшихся генотоксическому стрессу и о существовании CDK8/19-зависимого механизма, реализующегося только в p53-положительных клетках колоректального рака, что, безусловно, важно для клиники.

При оценке экспрессии p53-ассоциированных генов в случае комбинации облучения и ингибитора CDK8/19 автор убедительно демонстрирует, что сенексин Б снижает вызываемой действием радиации активацию экспрессии как гена *TP53*, так p53-зависимого гена *CDKN1A* в клетках с интактным p53. Данные вестерн-блоттинга показывают похожий характер изменения внутриклеточного уровня белков p53, p21, Рuma.

Получив подтверждение CDK8/19-зависимой активации p53, автор оценивает возможное влияние перепрограммирования транскрипции на белки p53-зависимого ответа на повреждение ДНК: киназу ATM, активирующуюся при двухнитевых разрывах ДНК; чекпойнт-киназу Chk2, фосфорилирующую p53 ATM-зависимым образом; E3-убиквитинлигазу Mdm2, вызывающую протеасомную деградацию p53. Только при радиационном воздействии

обнаружена активация (в обоих типах клеток) экспрессии генов, кодирующих сенсор двунитевых повреждений ДНК АТМ и зависимую от него киназу контрольной точки *Chk2*, тогда как экспрессия гена *MDM2* снижалась в клетках с интактным *p53*. Исследование экспрессии *TP53* на клетках с нокаутом гена *CDK8* показало схожие с нокаутом *p53* результаты.

Использование других ингибиторов *CDK8/19* (*BI-1347* - селективного ингибитора *CDK8/циклина С* и *PROTAC* - конъюгата для мишень-направленной протеолитической деградации белка) позволило автору подтвердить данные с сенексином Б: подавление киназной активности *CDK8/19* снижает активацию *TP53* в ответ на облучение, не влияя на уровень мРНК в покоящихся клетках.

Независимое использование ингибиторов *CDK8/19* (сенексина Б и *BI1347*) и ингибитора киназ *TBK1* и *IKKε* (*MRT67307*), активирующего транскрипционный фактор *NF-κB*, вызывало снижение активации экспрессии генов *TP53* и *CDKN1A*, тогда как их сочетанное действие приводило к восстановлению экспрессии генов в облученных клетках. При воспроизведении эксперимента на нетрансформированных клетках эмбриона почки человека *HEK293* Кучур О.А. получил аналогичный результат: восстановление экспрессии генов *TP53* и *CDKN1A* при одновременном ингибировании *CDK8/19* и *NFκB* во время лучевого воздействия. Автор делает вывод, что кофактор репрограммирования транскрипции *NFκB* частично опосредует срочную активацию *TP53* в облученных клетках. Восстановление уровня мРНК *p53* при облучении с одновременным применением ингибиторов *NFκB* и *CDK8/19* предполагает сложный механизм регуляции гена *TP53*, где *CDK8/19* и *NFκB*, возможно кооперируют в индукции провоспалительных цитокинов. Полученные результаты вестерн-блоттинга подтверждают данные ПЦР-анализа.

Таким образом, представленные результаты убедительно показывают, что цель исследования успешно достигнута: автором установлены молекулярные механизмы гибели опухолевых клеток человека с различным

статусом p53 при действии ионизирующего излучения и ингибировании CDK8/19. Установление связи транскрипционного фактора p53 и циклинзависимых протеинкиназ 8/19 имеет важное значение не только для развития фундаментальных представлений о процессах перепрограммирования, но и для разработки рациональных подходов к оптимизации консервативной терапии опухолей с использованием нетоксичных селективных ингибиторов перепрограммирования транскрипции.

Диссертация и автореферат структурированы и оформлены согласно требованиям нормативных документов. Содержание автореферата диссертации в полной мере отражает основные аспекты диссертационной работы. Цель, задачи, положения, выносимые на защиту и выводы, приведённые в автореферате, соответствуют таковым в диссертации.

Помимо высказанных выше замечаний, следует отметить отсутствие аббревиатуры и обозначения достоверных различий на рисунках, наличие которых заметно бы улучшило восприятие работы. Однако все указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

#### **Достоверность и новизна научных положений, выводов и заключений.**

Представленные в диссертации результаты получены на достоверном количестве экспериментального материала с использованием современных молекулярно-генетических, биохимических и клеточных методов исследования, что подтверждается соответствующим статистическим анализом. Выводы соответствуют полученным результатам.

Научная новизна полученных данных не вызывает сомнений. Автором впервые:

- выявлен феномен регуляции выживания опухолевых клеток, подвергнутых действию терапевтических доз ионизирующего излучения, в зависимости от статуса p53 и активности DK8/19;
- установлен механизм повышения гибели облученных клеток с интактным p53 при ингибировании CDK8/19;



- выявлены механизмы регуляции p53-зависимых событий через транскрипционный фактор NFkB при ингибировании CDK8/19;
- определены белки-партнеры p53, чувствительные и нечувствительные к ингибиторам CDK8/19.

Ключевые положения диссертации опубликованы в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в базах РИНЦ, Scopus и Web of Science. На основании полученных данных зарегистрирован патент РФ. Материалы работы успешно представлены на 7 международных и всероссийских научных конференциях.

Работа диссертационного исследования поддержана стипендией Президента РФ для обучающихся за рубежом (США), его основные разделы выполнены в рамках Мегагранта Правительства РФ и гранта РФФИ.

### **Заключение**

Таким образом, диссертация Кучура Олега Александровича на тему «Механизмы усиления гибели p53-положительных опухолевых клеток при комбинировании ионизирующего излучения и ингибиторов CDK8/19-зависимого перепрограммирования транскрипции», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. «Биохимия», является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача изучения молекулярных механизмов гибели опухолевых клеток с различным статусом p53 при действии ионизирующего излучения и ингибировании CDK8/19. Полученные данные позволили автору раскрыть существование связи p53- и CDK8/19-зависимого перепрограммирования в опухолевых клетках.

Диссертационная работа полностью соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям, установленным разделом 2 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а ее автор – Кучур Олег Александрович – достоин

присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 «Биохимия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,  
профессор кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т.,  
Медицинский институт, Федеральное государственное  
автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Российский университет дружбы народов»

Калинина Елена Валентиновна



14.04.2023

Контактные данные:

тел.: тел 8(495)7873803 доб.1987; e-mail: [kalinina\\_ev@rudn.ru](mailto:kalinina_ev@rudn.ru)  
Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация: 03.01.04 - Биохимия

Адрес места работы: 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский университет дружбы народов»,  
Медицинский институт,  
тел.: 8(495)7873803 доб.1987; e-mail: [kalinina\\_ev@rudn.ru](mailto:kalinina_ev@rudn.ru)

Подпись д.б.н., профессора Калининой Е.В. удостоверяю:

Ученый секретарь медицинского института  
к.фарм.н., доцент  
14.04.2023



Т.В. Максимова