

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Зверевой Марии Эмильевны
«Теломераза: механизмы функционирования и регуляции»,

представленную на соискание учёной степени доктора химических наук
по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология, 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертационная работа Зверевой М.Э. посвящена изучению теломеразы, представляющих собой многокомпонентный РНК-белковый комплекс, обладающей ферментативной активностью. Этот комплекс катализирует реакцию удлинения 3'-концов линейных хромосом и участвует в синтезе теломерной ДНК. Такая ДНК совместно со специализированными белками образует теломерные структуры, которые защищают концы хромосом от узнавания клеточными системами репарации и играют важную роль в контроле количества клеточных делений. Актуальность выбранного автором направления исследований подтверждена Нобелевской премией 2009 г. по медицине и физиологии, врученной Э. Блэкберн, Д. Шостаку, К. Грейдер за открытие теломер и процесса поддержания их функциональной структуры теломеразой. Это направление исследований имеет не только фундаментальную, но и прикладную значимость. Реактивация теломеразы в клетках злокачественных новообразований дает таким клеткам возможность делиться неограниченное число раз, что позволяет рассматривать теломеразу в качестве мишени для разработки направленной терапии онкологических заболеваний. Поиск ингибиторов теломеразы требует расширения фундаментальных знаний о процессах функционирования этого ферментативного комплекса.

Работа Зверевой М.Э. «Теломераза: механизмы функционирования и регуляции» построена традиционно. Основные части работы связаны друг с другом объектом и целями исследования. Вводная часть диссертации отражает актуальность и практическую значимость выбранной темы, формулирует нерешенные проблемы в области исследования теломеразных комплексов.

Обзор литературы логично вытекает из введения и рассматривает большой набор вопросов относительно состава, синтеза основных компонентов, образования, строения и функционирования теломеразного комплекса. Отдельно стоит отметить данные об альтернативных по отношению к поддержанию длины теломер функциях основных компонентов теломеразного комплекса. Эта часть обзора литературы позволяет критически взглянуть на утверждение, что подходы к ингибированию теломеразы могут привести к разработке инновационной направленной терапии онкологических заболеваний. После этой части обзора литературы раздел, посвященный направленной ингибированию теломеразной активности, воспринимается логично. Безусловную ценность представляет проведенный автором анализ возможных ограничений практического использования ингибиторов активности теломеразы различных классов.

Глава «Материалы и методы исследования» детально описывает экспериментальные подходы, которые разрабатывались или использовались для решения поставленных задач.

В главе «Результаты и их обсуждение» можно выделить следующие смысловые части: 1) изучение неизвестных особенностей функционирования теломеразы; 2) выбор и характеристика новой модельной системы для изучения функционирования теломер и теломеразы, позволяющей выйти за ограничения существующих модельных организмов; 3) проверка новых подходов для создания ингибиторов теломеразы.

Экспериментальные исследования теломеразного комплекса начинаются с использования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как наиболее удобного модельного организма. Внимание автора привлёк дополнительный компонент теломеразного комплекса *S. cerevisiae* - белок Est3. В работе впервые охарактеризованы его уникальные свойства - стимулирование диссоциации гибридного ДНК/РНК-дуплекса и способность гидролизовать GTP *in vitro*. Для сравнения различных видов дрожжей и преодоления нестабильности белков теломеразного комплекса *S. cerevisiae* при работе *in vitro* Зверева М.Э. предложила изучать новый модельный организм - термотолерантные дрожжи *Hansenula polymorpha*. Однако автору пришлось столкнуться с ограниченностью данных о генах, кодирующие основные компоненты теломеразы этого организма, с отсутствием методов оценки длины теломер и определения теломеразной активности. Эти проблемы были успешно решены в ходе выполнения диссертационной работы. В частности, была получена рекомбинантная форма каталитической субъединицы теломеразы и показана ее активность *in vitro*, что свидетельствует о перспективности этой системы для структурных исследований.

Наиболее значимым фундаментальным достижением работы Зверевой М.Э., на мой взгляд, является открытие нового механизма регуляции длины теломер у дрожжей *H. polymorpha*. Он основан на присоединении каталитической субъединицы теломеразы «дополнительного» T к растущему 3'-концу теломеры. В результате 3'-конец теломеры не может гибридизоваться с матричным участком теломеразной РНК, и синтез нового повтора становится невозможным. Это сенсационное для науки открытие позволяет направленно искать аналогичный процесс регуляции в клетках человека.

Следующую часть экспериментальной работы Зверевой М.Э. можно отнести к развитию прикладных аспектов исследований теломеразы, так как она направлена на поиск эффективных подходов к ингибированию теломеразы человека. Автором работы показана возможность нарушения сборки теломеразного комплекса при использовании оригинальных конструкций на основе нуклеиновых кислот, являющихся искусственным объединением двух олигодезоксирибонуклеотидов линкером ненуклеотидной природы. Альтернативным подходом к ингибированию теломеразы человека, проверенным в работе, стало использование соединений, моделирующих структурные особенности нуклеиновых кислот в

составе теломеразы – комплексов тиогидантоинов с ионами меди. Однако такие соединения расщепляют ДНК, что ограничивает их дальнейшее применение.

Анализ главы «Результаты и их обсуждение» позволяет сделать заключение об обоснованности интерпретации автором полученных данных и их соответствии мировому уровню. Выводы из работы соответствуют поставленным экспериментальным задачам.

К диссертационной работе имеется ряд замечаний.

1. В главе 1 «Обзор литературы» (74 страницы) количество иллюстраций сильно ограничено (15 рисунков), что затрудняет восприятие достаточно сложного материала. Особенно это касается разделов, где обсуждается пространственная организация компонентов теломеразы. Например, в разделе 1.5.4 автор не только не ссылается на рис. 9, демонстрирующий структуру высокого разрешения теломеразной обратной транскриптазы *Tribolium castaneum*, но и не приводит структуру комплекса этого белка с олигонуклеотидами, моделирующими ДНК/РНК-дуплекс в активном центре фермента. Вместе с тем, понимание структурной организации этого комплекса имеет ключевое значение в обсуждении механизмов функционирования теломеразного комплекса.
2. В главе 3 «Результаты и обсуждение» (раздел 3.1.1.3) указываются параметры, характеризующие гидролиз GTP, белком Est3 из дрожжей *S. cerevisiae* и его мутантных форм. В работе не указаны погрешности определения значений констант Михаэлиса-Ментен и максимальных скоростей ферментативных реакций.
3. В главе 3 «Результаты и обсуждение» (раздел 3.1.1.4) описывается предложенный Зверевой Э.М. оригинальный подход, позволивший продемонстрировать димеризацию белка Est3 из дрожжей *S. cerevisiae*. Однако разработка любого нового подхода предполагает его проверку с помощью традиционных методов (в данном случае это могло быть ультрацентрифугирование, эксклюзионная хроматография с использованием белковых маркеров молекулярной массы, ковалентное связывание субъединиц белка химическими реагентами и т.д.), что не было сделано.
4. В разделе 3.1.1.5. автор пытается сравнить свойства белка Est3 из дрожжей *S. cerevisiae* с родственным белком из дрожжей *H. polymorpha*. В отличие от Est3 из *S. cerevisiae* для Est3 из *H. polymorpha* не было обнаружено способности взаимодействовать с ДНК, образовывать димер и гидролизовать GTP. Вместе с тем, Зверева М.Э. не проверила такое важнейшее свойство белка Est3 из *H. polymorpha* как его способность стимулировать диссоциацию гибридного дуплекса ДНК/РНК.
5. Существенная часть работы Зверевой М.Э. посвящена разработке и оптимизации методов детекции или количественного определения активности теломеразы из клеток дрожжей или человека, соответственно. На мой взгляд, автору следовало обобщить свои достижения и предложить универсальную стратегию анализа теломеразной активности для любого эукариотического организма.

Указанные замечания не снижают общей высокой оценки диссертационной работы Зверевой М.Э. В работе создано новое направление исследований теломер и теломеразы на основе термотолерантных дрожжей, разработаны новые подходы к ингибированию теломеразы человека. Большой арсенал методов, предложенных Зверевой М.Э., может быть использован в лабораториях, где изучаются взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами: в Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте биологии гена РАН, Институте белка РАН, ФГУП «ГосНИИгенетика», в центре «Биоинженерия» РАН, Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и в ряде других научно-исследовательских институтов биохимического и молекулярно-биологического профиля. Для молекулярной онкологии значимы методы количественной оценки активности теломеразы человека, которые могут быть востребованы в НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Новизна работы Зверевой М.Э. и ее практическая значимость подтверждаются двумя патентами. Результаты, представленные в диссертации, опубликованы в высокорейтинговых международных журналах. Автореферат отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа Зверевой М.Э. полностью соответствует требованиям, установленным пунктом 2 «Положения о присуждении учёных степеней в Московском Государственном Университете имени М.В.Ломоносова», а ее автор заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальностям: 03.01.03 – молекулярная биология и 02.00.10 – биоорганическая химия.

Главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
доктор химических наук, профессор

Кубарева Елена Александровна

04.05.2018

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40
тел.: +7(495)939-54-11, e-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

Подпись Кубаревой Е.А. заверяю.

Директор Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
академик РАН



В.П. Скулачев