

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Зверевой Марии Эмильевны «Теломераза: механизмы функционирования и регуляции», представленную на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, 02.00.10 – биоорганическая химия.

Диссертационная работа Зверевой Марии Эмильевны посвящена изучению молекулярных механизмов работы теломеразы – многокомпонентного ферментативного РНК- белкового комплекса, отвечающего за компенсацию укорочения защитных структур (теломер) на концах линейных хромосом эукариот. Направление работы, несомненно, является очень актуальным. Оно представляет интерес не только с точки зрения фундаментальной науки, но и имеет важный прикладной аспект, так как нарушение регуляции работы теломеразы связано с процессом онкогенеза и обнаружено в клетках многих злокачественных новообразований. В то время как уровень теломеразы достаточно четко регулируется в нормальных клетках, в большинстве опухолей наблюдается ее активация, что позволяет клеткам опухоли преодолеть лимит Хейфлика. В настоящее время делаются многочисленные попытки использовать теломеразу как таргетный объект для борьбы с различными онкологическими заболеваниями. Это, в свою очередь, влечет необходимость глубокого понимания работы теломеразного комплекса и функций отдельных его компонентов. Необходимо отметить, что соискателю удалось удачно сочетать в своей работе исследование фундаментальных и прикладных аспектов проблемы. В данном исследовании автору пришлось преодолеть несколько очень сложных аспектов. Одним из них является то, что исследование теломеразы, в частности по причине ее связи с онкологией, является очень «горячей» областью молекулярной биологии. Таким образом, соискателю приходилось выдерживать конкуренцию с сильными международными коллективами. Кроме того, состав теломеразы и функции ее субъединиц несколько отличается у различных организмов, что делает необходимым ее исследование на различных моделях. Наконец, теломераза представляет собой сложный комплекс, включающий как белковые субъединицы, так и РНК, что делает очень сложным его исследование *in vivo* и *in vitro*. Уровень теломеразы в клетке достаточно низкий, что затрудняет ее выделение, а нестабильность теломеразного комплекса может влиять на адекватную трактовку результатов. Надо отметить, что автор успешно преодолел все обозначенные трудности, используя сочетания различных подходов молекулярной биологии и биоорганической химии, исследования в системах *in vivo* и *in vitro* и исследование теломеразы у различных организмов. Таким образом, работа представляет

собой интересное и актуальное исследование, проведенное на очень высоком экспериментальном уровне.

Работа включает три основных направления, тесно связанных друг с другом. Это экспериментальное исследование неизвестных аспектов работы теломеразы и ее субъединиц с неизвестной функцией. Это разработка новой модельной системы, позволяющей преодолеть ограничения существующих модельных систем и делающей возможной изучение теломеразы на новом уровне. Наконец, на основании созданной системы и полученных данных о новых свойствах теломеразы, проведена работа по созданию ее новых ингибиторов, которые потенциально могут применяться в терапии онкологических заболеваний.

Хотелось бы особенно отметить следующие выдающиеся результаты работы. Автором впервые показано, что у дрожжей *S. cerevisiae* белок Est3 способствует диссоциации гибридного ДНК/РНК - дуплекса, а также может димеризоваться и гидролизовать GTP *in vitro*. Автором была создана новая система для изучения свойств теломеразы и продемонстрирована перспективность ее использования. Используя именно эту систему, автору удалось показать новый механизм регуляции процессивности теломеразы. Автором был предложен универсальный подход на основе оригинальных НК-конструкций, представляющих собой два олигонуклеотида, соединенные линкером ненуклеотидной природы, который позволял исследовать сборку РНК-белковых комплексов и механизмы ее нарушения. С помощью такой конструкции удалось показать существование димера теломеразной РНК в активном теломеразном комплексе человека *in vitro*. Наконец, впервые был предложен новый класс соединений, имитирующий пространственное расположение двух нуклеотидов теломерного повтора человека и было показано, что такие соединения обладают способностью ингибировать теломеразу *in vitro*. Этот результат является очень важным, так как открывает новые возможности в терапии онкологических заболеваний.

Диссертация обладает внутренним единством и включает следующие разделы: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы», содержащий 391 ссылку и «Благодарности». Работу иллюстрируют 65 рисунков и 10 таблиц. Общий объем диссертации 260 страниц (без списка использованной литературы). Ниже приведена краткая оценка научного содержания и оформления основных разделов, с некоторыми замечаниями по каждому из них.

Введение к диссертации позволяет понять актуальность данной темы. В этом разделе четко сформулирована цель и экспериментальные задачи. Обзор литературы

охватывает широкий аспект проблем, связанных со структурой теломеры, теломеразного комплекса, с работой теломеразного комплекса и функцией его отдельных субъединиц. В обзоре подробно разбирается структура теломер, TERRA – РНК, синтезирующаяся на теломерах, структура теломеразного комплекса, его компоненты, ферментативная активность теломеразы, особенности сборки теломеразного комплекса и его пространственная структура. Очень интересны данные о функциях теломеразного комплекса и его компонентов, не связанных с поддержанием длины теломер. Данные об альтернативных функциях теломеразной РНК и каталитической субъединицы теломеразы. Они говорят о том, как разные процессы в клетке взаимосвязаны друг с другом и насколько взвешено надо подходить к внесению тех или иных изменений в работу клетки.

Обзор также содержит интересные разделы, посвященные направленному ингибированию теломеразной активности. Подробно рассматриваются ингибиторы теломеразы на основе аналогов нуклеотидов или нуклеозидов, низкомолекулярные соединения ненуклеозидной природы, олигонуклеотидные ингибиторы. Анализируются плюсы и минусы использования ингибиторов различных типов. Обзор логично подводит читателя к теме исследования, раскрывает ее актуальность и необходимость для решения стоящих перед исследователями вопросов. Главное, что хотелось бы отметить, что обзор литературы не является простым (пусть и объемным) перечислением известных фактов, а представляет собой аналитическое исследование, в котором все известные данные оцениваются автором в тесной связи друг с другом. В целом, обзор литературы полностью выполняет свою функцию и в достаточной степени вводит в курс темы исследования и стоящих перед автором научных задач, а также способствует пониманию и интерпретации полученных самим автором результатов.

Раздел «Материалы и методы исследования» содержит подробное и четкое описание разнообразных экспериментальных подходов, использованных автором в данной работе. Все методы изложены очень четко и ясно, что дает возможность полного их воспроизведения. В работе использованы как классические хорошо зарекомендовавшие себя методы, так и оригинальные новые подходы. Выбор методов исследования полностью соответствует поставленным задачам. Эта часть работы также дает наглядное представление, какая огромная и разносторонняя работа была проведена автором для получения результатов, описанных ниже.

В разделе «Результаты и их обсуждение» автор подробно, четко и логично описывает проведенные эксперименты, лежащие в основе выводов диссертационной работы. Все необходимые детали и логика проводимых экспериментов четко описаны, а их результаты наглядно проиллюстрированы. Автор начинает работу с исследования

теломеразного комплекса дрожжей *S. cerevisiae*, как наиболее удобной модели. В начале работы автор четко формулирует задачи, которые остаются нерешенными в исследовании теломеразы дрожжей и на решение которых будет направлена данная работа. Исследуется до этих пор неизученная субъединица теломеразного комплекса дрожжей, белок Est3, дополнительный компонент теломеразного комплекса. Автором впервые показано, что дрожжей *S. cerevisiae* белок Est3 способствует диссоциации гибридного ДНК/РНК - дуплекса, а также может димеризоваться и гидролизовать GTP *in vitro*. Показано, что это свойство является уникальным для белка Est3 *S. cerevisiae*. Решен вопрос, о необходимости димеризации теломеразного комплекса для синтеза повтора. Показано, что *in vitro* теломераза, существующая в виде мономера, может синтезировать повтор. Дрожжи *S. cerevisiae*, хотя и является очень распространенной моделью для исследования работы белковых комплексов в клетке, могут являться не оптимальной моделью для выделения и исследования теломеразы. Это связано с тем, что комплекс теломеразы может являться нестабильным при выделении. Поэтому автор предложила использование новой модели, дрожжей *H. polymorpha*. Некоторые штаммы *H. polymorpha* относят к термотолерантным, что обуславливает стабильность *in vitro* выделенных из них ферментов. Автор провел большую и сложную работу для характеристики *H. polymorpha* как модельной системы для исследования теломеразы. Был идентифицирован ген теломеразной РНК *H. Polymorpha*, определены границы матрицы теломеразной РНК, разработан метод определения теломеразной активности для теломеразы термотолерантных дрожжей, сконструирована *in vitro* система для проверки РНК-зависимой ДНК - полимеразной активности очищенного рекомбинантного белка hpTERT и др. В результате автором была создана новая система для изучения свойств теломеразы и продемонстрирована перспективность ее использования. Используя именно эту систему, автору удалось показать новый механизм регуляции процессивности теломеразы. Автор показал существования механизма ограничения длины теломер, закодированный в теломеразной РНК. Этот механизм связан с появлением «дополнительного» Т (позиция нуклеотида - A170) на 3'-конце вновь синтезированного повтора как *in vitro*, так и *in vivo* в ходе обратной транскрипции, осуществляемой теломеразой дрожжей *H. polymorpha*. Как следствие, продукт реакции теряет способность перемещаться в начало матричного участка теломеразной РНК и образовывать корректный гибридный РНК/ДНК - дуплекс. Это, безусловно, очень важный и интересный результат, полученный впервые в мировой науке. Результат тем более интересен, что автор приводит данные о возможности универсальности данного механизма. Поскольку автор еще ранее показал возможность димеризации компонентов теломеразы, было высказано предположение, что для

эффективной работы теломеразы человека также нужна стадия димеризации. Автором был предложен универсальный подход на основе оригинальных НК-конструкций, представляющих собой два олигонуклеотида, соединенные линкером ненуклеотидной природы, который позволял исследовать сборку РНК-белковых комплексов и механизмы ее нарушения. Это, безусловно, очень важный результат, который будет иметь универсальное применение. С помощью такой конструкции удалось показать существование димера теломеразной РНК в активном теломеразном комплексе человека *in vitro*. Также удалось ингибировать функционирование теломеразного комплекса.

Дальнейшая работа автора была направлена на решение прикладных аспектов, связанных с ролью теломеразы в онкогенезе. Было решено создать новые ингибиторы теломеразы. Создавать ингибиторы было решено на основе олигонуклеотидов, воздействующих на димер и/или блокирующих конформационное состояние теломеразной РНК (разветвленные олигонуклеотиды). Другим вариантом было использование олигонуклеотидов и низкомолекулярных соединений, моделирующих структуру НК, важную для функционирования теломеразы. В результате впервые был предложен новый класс соединений, имитирующий пространственное расположение двух нуклеотидов теломерного повтора человека и было показано, что такие соединения обладают способностью ингибировать теломеразу *in vitro* и расщеплять ДНК. Эта часть работы является очень важной, так как открывает новые возможности в терапии онкологических заболеваний.

Соединение Результаты и Обсуждения в один раздел имеет свою логику, так как позволяет сразу оценить результаты каждого эксперимента в контексте мировой науки. Автор полностью обосновывает интерпретацию полученных данных и на современном уровне объясняет свои результаты. Автор демонстрирует глубокое понимание своей темы исследования и полное владение разнообразными экспериментальными методиками и глубокое знание литературы по теме исследования.

В качестве замечания можно отметить, что хотелось бы понять биологический смысл существования механизма нарушения процессивности теломеразы, который открыл автор. Хотелось бы, чтобы автор высказал предположения о возможной роли данного механизма. Также интересно, что известно о функциональных аналогах белка Est3, важная функция которого была показана автором. Эти замечания ни в коей мере не влияют на высокую оценку данной работы.

Все данные, полученные в работе, являются совершенно новыми, что подтверждается высоким уровнем международных журналов, в которых они опубликованы. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений,

эксперименты сделаны в нескольких повторностях, результаты статистически обработаны, эксперименты сделаны на современном оборудовании.

Выводы сформулированы грамотно, четко, хорошо обоснованы и также полностью соответствуют поставленным экспериментальным задачам. Результаты работы опубликованы в высокорейтинговых международных журналах и доложены на многочисленных всероссийских и международных конференциях. Опубликованные работы и автореферат полностью отражают содержание диссертации.

Диссертационная работа Зверевой М.Э. полностью удовлетворяет требованиям, установленным в п. 2 «Положения о присуждении учёных степеней в Московском Государственном Университете имени М.В.Ломоносова», утвержденного ректором Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова 27 октября 2016 года, а её автор, несомненно, заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальностям 03.01.03 – «молекулярная биология» и 02.00.10 – биоорганическая химия.

член-корр РАН, доктор биологических наук,
профессор,

Лаборатория факторов транскрипции

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук
главный научный сотрудник

Тел: 8(499)135-9731

e-mail: sonjag@molbiol.edu.ru

Георгиева София Георгиевна

10/04/2018

*Ядвиге Георгиевне С.Т. удостоверение
учёной степени ИМБ РАН
Бочаров А.А.*

