

О Т З Ы В

официального оппонента о работе **Рубцовой Марии Петровны «Молекулярные механизмы биогенеза и функционирования теломеразной РНК человека»**, представленной на соискание ученой степени доктора химических наук по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология и 02.00.10 – биоорганическая химия.

Теломераза является перспективной мишенью для разработки подходов и средств терапии как онкологических заболеваний, так и заболеваний, связанных с преждевременным старением, регенерации тканей и увеличения продолжительности жизни. Известно, что примерно после 50 клеточных делений концевые участки хромосом – теломеры – становятся критически короткими, что приводит к нестабильности генома и активации клеточных программ гибели. При этом активация теломеразы, происходящая в 85-90% случаев онкологической трансформации клеток, способствует поддержанию длины теломер, необходимой для неограниченного деления. Кроме того, активация теломеразы способствует регенерации нормальных тканей, а мутации в генах компонентов этого фермента ассоциированы с заболеваниями, характеризующимися фенотипом преждевременного старения. Считается, что увеличение длины теломер позволит клеткам проходить большее количество делений, что обеспечит более длительное и здоровое функционирование организма.

Теломераза представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс, основными компонентами которого являются РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) и теломеразная РНК. Теломеразная обратная транскриптаза достраивает теломеры, используя в качестве матрицы внутренний участок теломеразной РНК. В настоящее время активно проводятся исследования теломеразы направленные не только на изучение состава, структуры и механизма работы активного комплекса, но и взаимодействия с субстратом – теломерой, сборки активного фермента, а также механизмов биогенеза компонентов теломеразного комплекса. Кроме того, в литературе все больше встречаются работы по изучению альтернативных функций компонентов теломеразного комплекса, изучению которых до недавнего времени уделялось недостаточно внимания ввиду их низкого содержания в клетке и сложности разделения эффектов, которые оказывает на клетки теломераза и ее компоненты по отдельности.

В связи с этим, работа М.П. Рубцовой, посвященная исследованию механизмов регуляции разных этапов функционирования теломеразы, затрагивающих формирование активного комплекса и взаимодействие с теломерами, а также биогенез и альтернативные функции теломеразной РНК человека, является современной и актуальной. В ходе выполнения работы Мария Петровна выполнила систематическое исследование, включающее изучение влияния репликативного белка А на активность теломеразы *in vitro*, анализ ингибирования сборки теломеразы человека с помощью блокирования структурных элементов теломеразной РНК, определение роли Интегратора в регуляции

транскрипции и процессинга теломеразной РНК человека, а также проведено доказательство трансляции теломеразной РНК человека и определение возможной биологической роли белка hTERP, образующегося в результате трансляции hTR.

На пути достижения основной цели диссертации соискателем использованы современные методы биохимии, молекулярной и клеточной биологии. Плазмиды нарабатывали в штаммах-продуцентах *E. coli*. Препараты плазмид и РНК получали с использованием специализированных наборов реагентов от ведущих фирм-производителей. Чистоту препаратов нуклеиновых кислот проверяли методами электрофореза и спектрофотометрии. Экстракты клеток получали согласно современным методикам с использованием реактивов ведущих фирм производителей. Создание клеточных линий осуществляли, используя новейшие подходы и методики, в том числе направленного редактирования генома. Сильной стороной работы является не только многообразие использованных методов, но и оптимизация некоторых методов для выполнения конкретных работ. Например, была проведена отработка и оптимизация метода TRAP (Telomerase Repeated Amplification Protocol), что позволило продемонстрировать предсказательный потенциал определения теломеразной активности в образцах биопсий предопухолевых поражений шейки матки. И, таким образом, в сотрудничестве с РОНЦ имени Н.Н. Блохина были осуществлены работы, посвященные разработке диагностикума опухолей шейки матки. Кроме того, соискателем разработаны подходы к сортировке клеток, которые позволили провести исследования в различных областях молекулярной биологии. Так, удалось изучить зависимость эффективности трансляции от структуры 5'-нетранслируемой области, разработать платформу для анализа биологического разнообразия и микробиологических сообществ, а также подходы к поиску лигандов для персонализированной терапии с использованием CAR-T клеток. Актуальность данных подходов подтверждается публикациями в высокорейтинговых журналах *Sci. Adv.* 2018, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018 и *Nucleic Acids Res.* 2017.

Работа М.П. Рубцовой построена по традиционному принципу, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 147 страницах, содержит 48 рисунков и 5 таблиц. Библиография включает 181 литературных источников.

Во введении очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, практическая ценность, а также цель и задачи диссертационной работы. Обзор данной литературы самым непосредственным образом связан с темой диссертации и помогает читателю лучше понять выбор направления исследований и значимость проделанной диссертантом работы. В обзоре рассматриваются структурно-функциональные особенности теломеры и теломеразы, а также компонентов теломеразного комплекса, включающего обратную транскриптазу, вспомогательные белки и теломеразную РНК. Представлены данные о биогенезе теломеразной РНК и ее

альтернативных функциях, установленных в настоящее время. Обзор написан хорошим литературным языком и содержит всю необходимую информацию для восприятия результатов данной диссертационной работы.

В экспериментальной части четко и подробно описаны многочисленные методики, использованные диссертантом в его работе. Данный раздел свидетельствует о высокой квалификации и прекрасной методической подготовке М.П. Рубцовой.

Глава «Результаты и их обсуждение» представляет собой итог работы М.П. Рубцовой и содержит четыре блока, посвященных влиянию репликативного белка А на взаимодействие теломеразы с теломерами, ингибированию сборки теломеразы человека с помощью блокирования структурных элементов теломеразной РНК, транскрипции и процессингу теломеразной РНК человека, а также трансляции теломеразной РНК.

В первом разделе результатов показано, что репликативный белок А (RPA) специфически взаимодействует с теломерными последовательностями ДНК и модулирует способность теломеразы удлинять субстрат – 3'-выступающий конец теломеры. Кроме того, это заключение и соответствующая публикация, оказались первыми в мире и инициировали направление исследований о влиянии RPA на функционирование теломеразы и теломер.

Затем автор переходит к изложению данных о биогенезе теломеразы. Биогенез теломеразного комплекса является многостадийным процессом, в котором каждый этап можно рассматривать в качестве потенциальной мишени для направленного воздействия в целях регуляции активности фермента. Ингибирование полимеразной активности теломеразы ввиду сходства ее каталитического центра с другими клеточными полимеразами приводит к многочисленным побочным эффектам, а блокирование матричного участка теломеразной РНК с помощью антисмысловых олигонуклеотидов оказывается неэффективным. Поэтому регулирование активности теломеразы за счет воздействия на биогенез теломеразного комплекса представляется наиболее перспективным в аспекте разработки новых терапевтических подходов в области онкологии, а также регенерации тканей и продления жизни. В качестве потенциальных мишеней были выбраны различные аспекты функционирования теломеразной РНК: блокирование антисмысловыми олигонуклеотидами структурных элементов, потенциально важных для сборки активного фермента и транскрипция и процессинг теломеразной РНК.

В ходе выполнения этой части работы соискателем выявлены структурные элементы теломеразной РНК человека, блокирование которых при помощи антисмысловых олигонуклеотидов приводит к ингибированию теломеразной активности. При этом фиксация определенной конформации hTERC при помощи химерных олигонуклеотидов полностью блокирует сборку фермента и ингибирует активность теломеразы. Исследование механизма транскрипции гена теломеразной РНК человека показало, что в регуляции синтеза и процессинга hTERC участвует мультикомпонентный комплекс

Интегратор. Интегратор в промотор-зависимой манере определяет положение терминации транскрипции, а также способствует привлечению клеточных компонентов, участвующих в процессинге или деградации теломеразной РНК человека, регулируя количество hTERC в клетке.

В последнем разделе автор проводит анализ кодирующей способности теломеразной РНК. Анализ первичной структуры гена теломеразной РНК человека, а также полученные данные о длине первичного транскрипта, его процессинге и локализации позволили предположить кодирующий потенциал классической некодирующей РНК. Доказательство существования продукта трансляции теломеразной РНК человека в клетке было проведено с помощью методов иммунофлуоресцентного анализа, иммуноблоттинга и масс-спектрометрии. Исследование возможности трансляции теломеразной РНК человека данными методами было проведено впервые. Результаты экспериментов, полученные при использовании трех независимых подходов, достоверно свидетельствуют о существовании белка, кодируемого hTR. При этом продукт трансляции hTR детектируется и в ядре и в цитоплазме клеток НЕК293Т с помощью антител к рекомбинантному белку hTERP. Кроме того, проведенные исследования свидетельствуют о том, что данный белок может быть вовлечен в регуляцию апоптоза и макроаутофагии. Было показано, что повышенное содержание hTERP защищает клетки в условиях индуцированного апоптоза. При этом не количество теломеразной РНК и уровень теломеразной активности, а количество функционального hTERP определяет выживаемость клеток в условиях индуцированного апоптоза. Кроме того, установлено, что мутации N-конца белка hTERP влияют на превращение белка LC3I в LC3II, которое происходит на начальном этапе формирования аутофагосомы.

Все указанные выше результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. Сформулированные М.П. Рубцовой выводы работы основаны на результатах многочисленных экспериментов, причем в большинстве случаев автором использовано несколько взаимодополняющих экспериментальных подходов. В целом достоверность результатов работы и обоснованность выводов не вызывают сомнения.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 16 статьях. Результаты работы докладывались на престижных российских и международных конференциях. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации.

Подводя итог, необходимо отметить, что полученные в данной работе результаты, несомненно, являются значительным шагом по изучению функционирования компонентов теломеразного комплекса человека, каждый из которых является потенциальной мишенью для разработки новых подходов к воздействию на пролиферативный потенциал клетки в целях регуляции процессов опухолеобразования, а также продолжительности жизни и регенерации тканей.

Тем не менее, к работе есть несколько вопросов и замечаний, которые можно разделить на технические, связанные с оформлением материалов диссертации и экспериментальные.

В целом необходимо отметить, что текст диссертации написан хорошим русским языком, а имеющиеся в работе единичные мелкие опечатки, неудачные формулировки, конечно, не носят принципиального характера и не влияют на общую высокую научную значимость полученных автором результатов и сформулированных выводов. Однако следует отметить, что некоторые надписи на рисунках совершенно не читаемы (например, рисунок 30Б, 40Б и 40В), два рисунка в тексте имеют номер 27 (стр. 91 и 93), а на некоторых рисунках, отсутствуют подписи, поясняющие использованные обозначения.

В качестве вопросов к экспериментальной части работы можно выделить:

- 1) Автором показано, что белок RPA участвует в регуляции взаимодействия теломеразы с теломерами, за счет взаимодействия с G-квадруплексными структурами и вытеснения теломерных белков с ДНК, что облегчает взаимодействие с теломеразой. Дальнейшее увеличение концентрации RPA приводит к блокировке теломерных участков за счет кооперативного связывания. При этом к экстракту из 20 клеток HeLa добавляли очень высокую концентрацию рекомбинантного белка RPA (до 0,5 мМ). Возникает вопрос о величине константы связывания RPA с ДНК, так как при таких высоких концентрациях белка с одной стороны могут образовываться неспецифические комплексы, а с другой стороны эффект действия на теломеразу может быть связан с какими-либо примесями, вносимыми в реакционную смесь вместе с рекомбинантным белком. Кроме того, контроль этого эксперимента, включающий анализ эффекта другого ДНК-связывающего белка SSB при таких же высоких концентрациях, также требует пояснения в виде сравнения констант связывания этих двух белков (SSB и RPA) с ДНК. Так как в случае существенного отличия констант связывания этих белков с ДНК, наблюдаемые эффекты при одинаковых концентрациях могут быть разными не за счет разной природы белков, а за счет разной эффективности связывания с ДНК в данных экспериментальных условиях.
- 2) При анализе количества теломеразной РНК и длины теломер в клетках было показано, что количество теломеразной РНК снижалось на 60-70% в случае использования shRNA#1 и 2. Однако анализ длины теломер выявил значительное укорочение концевых участков хромосом только в случае использования shRNA#2. При этом в диссертации не обсуждается вопрос, почему при уменьшении количества теломеразной РНК в случае использования shRNA#1 не происходит достоверное уменьшение теломер. Хотелось бы, чтобы этот момент был как-то объяснен в работе.

3) При стабилизации структурных элементов теломеразной РНК использовали химерные олигорибонуклеотиды, состоящих из двух олигонуклеотидов, комплементарных разным участкам РНК, и 1,3-пропандиолового линкера. К этой части работы возникает два вопроса. Каким образом проводился выбор и, возможно, оптимизация длины линкерной части в составе химерной последовательности, так как расстояние между «целевыми» участками теломеразной РНК в некоторых случаях может быть больше, чем длина пропандиолового фрагмента? Было установлено, что применение химерных олигонуклеотидов, фиксирующих определенную конформацию теломеразной РНК, значительно усиливает эффективность ингибирования сборки теломеразы и теломеразной активности в сравнении с индивидуальными олигонуклеотидами. Однако, на мой взгляд, в тексте недостаточно подробно описано каким образом было установлено, что происходит стабилизация той или иной конформации молекулы РНК, а не аддитивный эффект от двух олигонуклеотидных фрагментов в составе химерной молекулы.

Необходимо отметить, что все указанные недочеты никоим образом не снижают общего высокого уровня работы, которая является высококласным научным исследованием. Анализ диссертационной работы М.П. Рубцовой свидетельствует о том, что, без сомнения, результаты работы служат важнейшим шагом по изучению молекулярных механизмов биогенеза и функционирования теломеразной РНК человека.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» (по химическим наукам) и специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Автор диссертации, Мария Петровна Рубцова, без сомнения, заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальностям 02.00.10 – «биоорганическая химия» (химические науки) и 03.01.03 – «молекулярная биология» (химические науки).

Доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории
исследования модификации биополимеров

федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук

Кузнецов Никита Александрович

Контактные данные:

тел.: +7 (383) 363-51-74, e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.04 –
биохимия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической
биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии
наук (ИХБФМ СО РАН)

Тел.: +7 (383) 363-51-74, e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

28 октября 2019 г.

