

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени доктора химических наук Рубцовой Марии Петровны на тему: «Молекулярные механизмы биогенеза и функционирования теломеразной РНК человека», по специальностям 02.00.10 – биоорганическая химия (химические науки) и 03.01.03 – молекулярная биология (химические науки).

Теломераза – фермент, достраивающий теломерные повторы на концах линейных хромосом эукариот. Пролиферативный потенциал клеток определяется длиной теломерных участков. При каждом клеточном делении происходит укорочение теломер; критическое укорочение этих участков приводит к гибели клеток. Теломераза неактивна в большинстве соматических клеток, а ее активация ассоциирована с процессами онкологической трансформации клеток, а также регенерации тканей. Снижение активности теломеразы в стволовых клетках в случае появления мутаций в генах компонентов этого фермента приводит к развитию тяжелых генетических заболеваний, демонстрирующих фенотип преждевременного старения. Контролируемая активация теломеразы позволит обеспечивать эффективную регенерацию тканей и омоложение организма без угрозы развития онкологических заболеваний, а специфическое ингибирование фермента позволит предложить новые подходы к терапии онкологических заболеваний. Для разработки подходов к контролируемой регуляции активности теломеразы необходимо полное понимание всех аспектов экспрессии компонентов комплекса, их биогенеза, сборки активного фермента и взаимодействия его с субстратом. В связи с этим, актуальность, новизна и практическая значимость работы М.П. Рубцовой, в которой изучены молекулярные механизмы регуляции функционирования теломеразы человека на разных этапах ее биогенеза, а также альтернативные функции теломеразной РНК человека, не вызывает сомнений.

Работа М.П. Рубцовой построена по традиционной схеме и состоит из следующих глав: 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 литературный источник.

Введение позволяет с первых строк оценить актуальность, научную новизну, практическую ценность, а также цель и задачи диссертационной работы. Обзор литературы полностью отражает современные знания обо всех аспектах функционирования теломеразы, непосредственно связан с темой диссертации и обеспечивает читателя всей необходимой информацией для понимания целей, задач исследования, а также значимость полученных результатов. В обзоре рассмотрены все аспекты функционирования теломеразы, исследованные в настоящей работе. Описаны структурно-функциональные особенности теломер и теломеразы, а также взаимодействия фермента с субстратом. Отдельные разделы посвящены биогенезу теломеразной РНК человека и ее альтернативным функциям.

Глава «Материалы и методы исследования» позволяет убедиться в высоком профессиональном уровне исследователя. В ходе выполнения исследования М.П. Рубцова применяла новейшие подходы, используя широкий спектр методов клеточной, молекулярной биологии, генетической инженерии, биохимии. Разработке и оптимизация методик, осуществленная в рамках настоящей работы, позволила М.П. Рубцовой принять участие в нескольких исследованиях в различных областях молекулярной и клеточной биологии.

Глава «Результаты и их обсуждение» разделена на четыре блока, каждый из которых посвящен исследованию одного из аспектов биогенеза или функционирования теломеразной РНК человека.

Теломераза содержит два основных компонента, необходимых для каталитической активности фермента - теломеразную обратную транскриптазу и теломеразную РНК. Фермент удлиняет теломеры, используя

в качестве шаблона матричный участок теломеразной РНК. Интересно, что экспрессия гена теломеразной РНК человека происходит практически во всех типах клеток на протяжении всей жизни человека, в то время как обратная транскриптаза присутствует в определенных клетках и ее наличие ассоциировано с теломеразной активностью. Биогенез теломеразы является сложным многостадийным процессом, в ходе которого происходит синтез, процессинг и локализация компонентов комплекса. Важным этапом функционирования теломеразы является взаимодействие фермента с субстратом – теломерой. Удлинение теломер происходит в конце S-фазы клеточного цикла, требует изменения структуры теломер и изменения состава теломер-ассоциированных белков.

В ходе исследования автор продемонстрировала, что репликативный белок А (RPA) вовлечен в регуляцию теломеразной активности в экстрактах клеток. Эти данные позволили предположить, что RPA, взаимодействуя с 3'-выступающим одноцепочечным участком теломер, вытесняет теломерные белки из теломерного комплекса, позволяя теломеразе достраивать повторы. Избыток RPA, наоборот, блокирует возможность взаимодействия фермента с субстратом.

Одним из последних этапов биогенеза теломеразы является формирование активного комплекса, т.е. ассоциация обратной транскриптазы с теломеразной РНК. В этом процессе принимают участие дополнительные белки. Теломеразная РНК человека представляет собой структурный каркас комплекса и формирование правильной третичной структуры необходимо для ассоциации с белковой субъединицей фермента и эффективной работы теломеразы. М.П. Рубцовой удалось выявить структурные элементы теломеразной РНК человека, блокирование которых нарушает функционирование фермента. Оказалось, что фиксация одной из конформаций теломеразной РНК человека, обеспечиваемая химерными олигонуклеотидами, блокирует сборку фермента и ингибирует работу теломеразы.

Несмотря на интенсивные исследования процессинга теломеразной РНК человека механизм регуляции транскрипции этого гена оставался неизвестным. М.П. Рубцова разработала репортерную систему для изучения экспрессии гена теломеразной РНК человека, которая позволила продемонстрировать ключевую роль комплекса Интегратор в регуляции транскрипции hTERC. Оказалось, что Интегратор в промотор-зависимой манере обеспечивает терминацию транскрипции теломеразной РНК человека, что было подтверждено при помощи ингибирования экспрессии генов компонентов Интегратора при помощи РНК-интерференции. Снижение уровня экспрессии генов компонентов Интегратора приводило к накоплению в клетках удлиненного с 3'-конца первичного транскрипта теломеразной РНК человека. Биоинформатический анализ первичной структуры этого предшественника выявил открытую рамку считывания. М.П. Рубцовой удалось подтвердить трансляцию теломеразной РНК человека, идентифицировать белок и продемонстрировать защитные свойства белка hTERP в условиях индукции апоптоза, а также его влияние на протекание аутофагии.

Все полученные результаты являются оригинальными. Использование нескольких подходов для верификации полученных данных позволяют не сомневаться в достоверности полученных результатов. Сделанные по полученным данным выводы обоснованы и полностью отражают результаты работы.

Материалы работы опубликованы в 16 статьях, индексируемых в базах данных Web of Sciences, Scopus или РИНЦ. Результаты работы многократно докладывались на российских и международных конференциях. Публикации и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертационной работы.

В заключении необходимо отметить, что результаты работы М.П. Рубцовой соответствуют последним мировым тенденциям в области исследования теломеразы и приносят значимый вклад в понимание различных

аспектов функционирования теломеразной РНК человека, как в составе теломеразного комплекса, так и в качестве самостоятельного компонента клетки. Полученные данные безусловно будут способствовать более глубокому пониманию молекулярных механизмов функционирования теломеразы, что позволит разрабатывать новые подходы к воздействию на пролиферативный потенциал клеток в целях регуляции процессов онкологической трансформации, а также регенерации тканей.

В целом следует отметить, что диссертационная работа М.П. Рубцовой 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, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Рубцова Мария Петровна заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальностям 02.00.10 – «биоорганическая химия» (химические науки) и 03.01.03 – «молекулярная биология» (химические науки).

Официальный оппонент:
доктор химических наук,
профессор, член-корреспондент РАН,
заведующий лабораторией
молекулярных основ действия
физиологически активных соединений
Федеральное государственное учреждение науки
Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта
РАН

Кочетков Сергей Николаевич

