

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Шепелева Никиты Михайловича
на тему: «Некоторые аспекты функционирования теломеразного
комплекса у дрожжей и человека»
по специальностям 1.4.9. Биоорганическая химия и 1.5.3.
Молекулярная биология

Диссертационная работа Никиты Михайловича Шепелева посвящена изучению функционирования вспомогательных белков теломеразы дрожжей или человека. Теломераза позволяет эукариотическим клеткам неограниченно делиться за счет поддержания длины их теломер, защитных структур на концах хромосом, состоящих из коротких повторов ДНК и связанных белков. Теломеры укорачиваются при каждом делении клетки. Если теломеры становятся критически короткими, то они более не могут защищать концы линейных хромосом, и такая ситуация воспринимается клеткой как повреждение ДНК, сопровождаемое остановкой клеточного цикла. Некоторые клетки могут активировать теломеразу для удлинения теломер и пролиферации. Это явление наблюдается в большинстве раковых клеток. Тем не менее теломераза также активируется в нормальных клетках, когда требуется активная пролиферация, например, при эмбриональном развитии.

Теломеразная РНК и теломеразная обратная транскриптаза являются ключевыми компонентами теломеразного комплекса. Однако его сборка и его активация требуют участия множества вспомогательных белков. Биогенез теломеразы является сложным процессом, который регулируется на каждом этапе при участии вспомогательных белков. Большинство работ обходят стороной данную тему и сосредотачиваются на непосредственном изучении теломеразной активности в различных условиях. Тем не менее

именно понимание стадий биогенеза теломеразы и роли каждого участника в этом процессе поможет выявить оптимальные мишени для регуляции активности теломеразы в каждом конкретном случае. В свою очередь это позволит влиять на процессы, где важна теломеразная активность: регенерация, предотвращение старения и борьба с онкологическими заболеваниями. Таким образом, раскрытие функциональной роли вспомогательных белков в биогенезе и активности теломеразы представляет собой важную задачу.

В своей работе автор впервые показал, что вспомогательный белок Est3 принципиально нужен для активности теломеразы дрожжей *H. polymorpha*. В работе было показано, что белок Est3 привлекается в теломеразный комплекс *H. polymorpha* именно белком Est1, а не теломеразной обратной транскриптазой. Автор также обнаружил взаимозависимость белков Est1 и Est3 при ассоциации с теломеразной РНК. Кроме того, автор впервые продемонстрировал, что поли(АДФ-рибозил)ирование влияет на РНК-связывающие свойства белков DKC1 и GAR1 человека, что также влияет на сборку и активность теломеразного комплекса человека.

Обоснованность и достоверность научных положений представленной работы подтверждается как наличием необходимых контролей и повторов в экспериментах, так и представлением полученных результатов в трех статьях в рецензируемых научных журналах. Результаты работы были апробированы на четырех российских и международных конференциях. Таким образом, обоснованность данной работы не вызывает сомнений.

Диссертация изложена на 139 страницах и содержит 3 таблицы и 31 рисунок. Список цитируемой литературы включает 236 источников. Основные экспериментальные данные получены диссертантом лично или при его непосредственном участии. Работа Н.М. Шепелева имеет классическое оформление и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение и выводы. Раздел

«Введение» содержит краткое и емкое изложение актуальности работы, цели и задач исследования, его научной новизны, теоретической и практической значимости работы, а также методологии, использованной в диссертационном исследовании. Здесь же даны положения, выносимые на защиту, и приведена информация об апробации работы, количестве публикаций и личном вкладе автора.

В разделе «Обзор литературы» подробно описаны стадии биогенеза и сборки теломеразного комплекса у дрожжей и человека. Отдельно стоит отметить качественные иллюстрации, которые объединяют и систематизируют литературные данные. Обзор литературы также включает рассмотрение поли(АДФ-рибозил)ирования и поли(АДФ-рибоза)-полимераз. Таким образом, обзор литературы полностью соответствует объектам изучения данной работы.

Раздел «Материалы и методы» описывает используемые в работе реагенты, буферные растворы и культуральные среды. Здесь также приведены списки олигонуклеотидов и штаммов, использованных в работе. Применяемые автором методики описаны достаточно подробно, что должно позволить их воспроизвести без каких-либо трудностей.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор непосредственно проводит описание полученных данных и делает промежуточные выводы. Объем исследований, которые провел Н.М. Шепелев, представляется значительным. Результаты снабжены соответствующими иллюстрациями. Данный раздел содержит в себе две смысловые части, которые объединены общей темой функционирования вспомогательных белков в теломеразном комплексе. Первая часть посвящена изучению функционирования вспомогательного белка Est3 в дрожжевой теломеразе *H. polymorpha*, а вторая – влиянию поли(АДФ-рибозил)ирования белков DKC1 и GAR1 на их РНК-связывающие свойства, а также его влияние на сборку и биогенез теломеразного комплекса. В начале автор проводит постановку задачи и

поясняет, почему были выбраны объекты исследования данной работы и что автор предполагает обнаружить, проводя свое исследование. В первой части работы автор демонстрирует, что использованные в работе штаммы *H. polymorpha* с добавленным НА-эпитопом на С-конец белков теломеразы не отличаются от дикого типа в функционировании теломеразы. Далее при контроле выделяющейся теломеразной обратной транскриптазы и совыделяющейся теломеразной РНК автор показывает принципиальную необходимость белка Est3 для теломеразной активности иммунопреципитированной теломеразы. Автор демонстрирует, что белок Est3 привлекается в теломеразный комплекс дрожжей именно белком Est1, а не теломеразной обратной транскриптазой при помощи коиммунопреципитации. В свою очередь, белок Est3 также способствует ассоциации белка Est1 с теломеразной РНК. Во второй части своей работы Н.М. Шепелев показывает, что белки DKC1 и GAR1 подвергаются поли(АДФ-рибозил)ированию, а затем при помощи нескольких различных методов демонстрирует, что данная модификация влияет на РНК-связывающие свойства данных белков. Далее было установлено, что нокдаун PARP1, главной поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, влияет на сборку теломеразного комплекса и на его активность. В конце работы показано, что длительный нокдаун PARP1 приводит к удлинению теломер при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ* и анализа длины теломер.

На основании полученных результатов сделаны правильные выводы. Результаты работы автора описаны в 3 статьях в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах, а также представлены на 4 российских и международных конференциях. Высокий уровень публикаций подчеркивает значимость полученных результатов диссертационной работы для дальнейшего развития данной области.

Тем не менее при прочтении представленной рукописи возник ряд замечаний и вопросов...

1. В работе изучаются теломеразы из метилотрофных дрожжей и человека. В качестве объекта сравнения достаточно активно обсуждается теломераза из пекарских дрожжей. *S/cerevisiae*. а что известно про теломеразу из *Schizosaccharomyces pombe* ? Их считают более адекватной моделью чем *Saccharomyces*

2. В материалах и методах автор не дает описание некоторых методик, использованных в работе: получения стабильной клеточной линии с помощью лентивирусного вектора, ультрацентрифугирования через сахарозную подушку и FISH. Аналогично замечание по поводу того, что в тексте работы автор пишет «богатая среда», но не уточняет что это за среда. Это тоже надо делать, поскольку вариатов богатых сред много и они по разному могут влиять на клетки при культивировании.

3. В разделе "Результаты и их обсуждение" содержится много литературных данных о белке Est3. По крайней мере часть из них можно перенести в "Обзор литературы".

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.4.9. Биоорганическая химия и 1.5.3. 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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Шепелев Никита Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.9. Биоорганическая химия и 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор,
профессор кафедры химической энзимологии
химического факультета Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования «Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Тишков Владимир Иванович

Специальность, по которой официальным оппонентом
защита диссертация:

02.00.15 – Кинетика и катализ

Специальность, по которой официальному оппоненту
присвоено звание профессора:

03.00.04 – Биохимия

Адрес места работы:

119991, г. Москва, мкр. Ленинские Горы, д. 1, с. 11Б,
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», химический факультет,
кафедра химической энзимологии
Тел.: +7 (495) 939-32-08; e-mail: tishkovvi@my.msu.ru

Подпись сотрудника

Химического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»
В.И. Тишкова удостоверяю: