

**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**

Теломераза является перспективной мишенью для разработки подходов и средств терапии как онкологических заболеваний, так и заболеваний, связанных с преждевременным старением, а также 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.

Следует отметить, что недостаток и мутации основных компонентов теломеразы и вспомогательных белков влияют на активность теломеразы на теломерах. Биогенез этих компонентов регулируется на каждом этапе: от транскрипции и процессинга РНК до созревания и посттрансляционных модификаций белка. Поэтому важной задачей является исследование механизмов регуляции биогенеза и активности теломеразы для разработки подходов, с помощью которых можно манипулировать теломеразой для управления регенерацией, предотвращения старения и лечения онкологических заболеваний.

В связи с этим, работа Н.М. Шепелева, направленная на определение некоторых аспектов функционирования вспомогательных белков, а также их посттрансляционных модификаций, в составе теломеразного комплекса дрожжей или человека, является современной и актуальной. В ходе выполнения работы Никита Михайлович установил роль белка Est3 в теломеразной активности дрожжей *Hansenula polymorpha* и идентифицировал компоненты теломеразы, ответственные за ассоциацию этого белка с теломеразной РНК, также в ходе работы выполнена оценка влияния поли(АДФ-рибозил)ирования белков DKC1 и GAR1 человека на активность теломеразы и проведен анализ влияния поли(АДФ-рибозил)ирования на РНК-связывающие свойства белков DKC1 и GAR1 человека.

На пути достижения основной цели диссертации соискателем использованы современные методы биохимии, молекулярной и клеточной биологии. При помощи иммунопреципитации теломеразы за аффинный эпитоп на белке TERT, контроля количества выделяющегося белка TERT методом вестерн-блоттинга, ПЦР в режиме реального времени для оценки количества совыделяющейся теломеразной РНК и анализа теломеразной активности *in vitro* определена роль вспомогательного белка Est3 и пути его привлечения в теломеразный комплекс *H. polymorpha*. При помощи вестерн-блоттинга обнаружено значительное снижение содержания белка TERT при инактивации генов *EST1*, *EST3* и *TER*, кодирующих другие компоненты теломеразного комплекса *H. polymorpha*. При помощи коиммунопреципитации РНК за белки DKC1 и GAR1, меченные меткой FLAG, впервые показано, что поли(АДФ-рибозил)ирование влияет на связывание РНК белками H/ACA-комплекса DKC1 и GAR1. Четыре различных подхода было использовано для определения влияния поли(АДФ-рибозил)ирования белков DKC1 и GAR1: экспрессия мутантных *DKC1* и *GAR1*, нокдаун *PARP1*, сверхэкспрессия *PARP1* и ингибирование активности *PARP1* малой молекулой. Используя метод FISH было выявлено накопление различных аномалий теломер, включая концы хромосом без детектируемых теломер и

слияние концов хромосом и хроматид. Сборка теломеразного комплекса была исследована путем иммунопреципитации за hTERT. Таким образом, соискателем освоен и успешно использован широкий арсенал современных методов исследования.

Работа Н.М. Шепелева 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 139 страницах, содержит 31 рисунок и 3 таблицы. Библиография включает 236 литературных источников.

Во введении очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, практическая ценность, а также цель и задачи диссертационной работы. Соискатель подробно описал личный вклад и вклад соавторов в опубликованные по теме диссертации статьи.

Обзор данных литературы самым непосредственным образом связан с темой диссертации и помогает читателю лучше понять выбор направления исследований и значимость проделанной диссертантом работы. В обзоре литературы рассмотрены состав и биогенез теломеразы дрожжей и человека, а также подробно описано функциональное значение поли(АДФ-рибозил)ирования у эукариот. Следует отметить необычный стиль соискателя при формировании некоторых подписей к рисункам, например, подпись к рисунку 4 располагается на двух страницах и имеет 6 ссылок на литературные источники. Возможно, часть этой подписи следовало бы перенести в основной текст данного раздела.

В экспериментальной части достаточно полно описаны все условия проведенных экспериментов. В качестве технического замечания к данному разделу можно отметить следующее. Как отмечено в личном вкладе автора – в ходе выполнения данной работы соискателем получены и охарактеризованы штаммы дрожжей *Hansenula polymorpha* с нокаутами генов компонентов теломеразы. Однако раздел «Материалов и методов», озаглавленный как «Штаммы, плазмиды и клеточные линии, использованные в работе», не

содержит какого-либо текстового описания, а включает единственную таблицу с указанием использованных штаммов. Несмотря на то, что в разделе «Результаты и их обсуждение» приведено описание подхода, который использовался для получения некоторых штаммов из данной таблицы, методическую часть работы, содержащую описание процедуры получения штаммов, следовало представить в разделе «Материалов и методов».

Глава «Результаты и их обсуждение» представляет собой итог работы соискателя и содержит два отдельных блока, посвященных функционированию белков Est3, Est1 и TERT в теломеразе *H. Polymorpha* и роли поли(АДФ-рибозил)ирования в регуляции биогенеза и стабильности теломеразного комплекса человека.

В первом блоке работе при помощи иммунопреципитации теломеразы за аффинный эпитоп на белке TERT, контроля количества выделяющегося белка TERT методом вестерн-блоттинга, ПЦР в режиме реального времени для оценки количества совыделяющейся теломеразной РНК и анализа теломеразной активности *in vitro* впервые показано, что вспомогательный белок Est3 принципиально необходим для активности теломеразы дрожжей *H. polymorpha in vitro*. При этом белок Est3 привлекается в теломеразный комплекс *H. polymorpha* белком Est1. Кроме того, в работе выявлена взаимозависимость Est1 и Est3 при ассоциации с теломеразной РНК.

Результаты, полученные во втором блоке работы свидетельствуют о том, что поли(АДФ-рибозил)ирование влияет на связывание РНК белками H/АСА-комплекса DKC1 и GAR1. Установлено, что длительный нокдаун PARP1 в клетках HEK293T приводит к значительному удлинению теломер. При этом содержание белков DKC1 и hTERT снизилось в клетках с нокдауном *PARP1*, а количество теломеразной РНК возросло, что свидетельствует о стабилизации теломеразного комплекса в условиях недостатка *PARP1*.

Все указанные выше результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. Сформулированные Н.М. Шепелевым 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.

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.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 3 статьях. Результаты работы докладывались на российских и международных конференциях. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации.

В качестве вопроса к экспериментальной части работы следует отметить следующее:

Для изучения влияния ПАРилирования на взаимодействие белков ДКС1 и GAR с РНК-партнерами были получены конструкции, кодирующие мутантные формы данных белков, несущие, соответственно, 6 и 5 замен остатков аспартата и глутамата. Однако в диссертации не описано был ли это набор векторов с одиночными заменами или один вектор одновременно нес все выбранные замены, почему их было именно столько, экспериментальный раздел в «Материалах и методах» по этому вопросу также отсутствует. Кроме того, отсутствует обоснование выбора конкретных остатков в данных белках. Несмотря на то, что остатки аспартата и глутамата являются основными, они не являются единственными сайтами ПАРилирования, что подтверждается достаточно высоким уровнем ПАРилирования мутантной формы ДКС1. При этом множественный мутагенез может привести к непредсказуемым структурным изменениям. Что и было продемонстрировано в случае мутантной формы GAR1, для которой ПАРилирование не происходило, при этом замены аминокислотных остатков приводили к изменению подвижности в геле, косвенно свидетельствуя об их влиянии на структуру. Это, в свою

очередь, поставило перед соискателем дополнительную задачу по разделению вкладов в наблюдаемые эффекты от непосредственно ПАРилирования и от потенциальных структурных изменений, вызванных аминокислотными заменами. Причем разделение этих вкладов является нетривиальной задачей, так как ингибирование PARP1 олапарибом не может полностью заблокировать ПАРилирование «природного» GAR1, о чем пишет сам соискатель. И, как следствие, к этой серии экспериментов возникает вопрос – можно ли на основании полученных данных в полной мере утверждать, что именно ПАРилирование влияет на взаимодействие белков DKC1 и GAR с РНК?

Подводя итог, необходимо отметить, что полученные в данной работе результаты, несомненно, подчеркивают важную роль вспомогательных белков и их посттрансляционных модификаций для биогенеза теломеразного комплекса. Сильной стороной представленной работы является использование альтернативных модельных организмов для изучения теломеразного комплекса, что, в совокупности с литературными данными, позволяет получить более полную картину функционирования теломеразы. Как один из важных результатов данной работы, полученный впервые, следует отметить значительное удлинение теломер при ингибировании поли(АДФ-рибозил)ирования, свидетельствующее об активации теломеразы. Полученные результаты дают ценную информацию о сложном взаимодействии между PARP1, активностью теломеразы и механизмами поддержания теломер.

Указанные в отзыве 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,  
заведующий лабораторией генетических технологий  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»

Кузнецов Никита Александрович

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.04 – Биохимия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 8  
ФГБУН «ИХБФМ СО РАН», лаборатория генетических технологий  
Тел.: 8 (383) 363-51-75; e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Подпись сотрудника

ИХБФМ СО РАН Н.А. Кузнецова удостоверяю: