

**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 Шепелева Никиты Михайловича «Некоторые аспекты функционирования теломеразного комплекса у дрожжей и человека» представляет собой комплексное исследование, посвященное выяснению роли отдельных белков и посттрансляционных модификаций в функционировании теломеразного комплекса. Актуальность работы Никиты Михайловича не вызывает сомнений. Активность теломеразы позволяет клеткам поддерживать пролиферативный потенциал, что имеет особое значение в процессе эмбриогенеза и для нормального функционирования стволовых клеток. Кроме того, теломераза активируется в опухолевых клетках и, в этой связи, является мишенью для терапии различных онкологических заболеваний, что делает ее изучение перспективным с точки зрения разработки новых лекарственных препаратов. При исследовании функционирования теломеразного комплекса, целесообразно использовать модельные организмы. Классическим модельным организмом молекулярной биологии являются почкующиеся дрожжи. В своей работе Шепелев Н.М. использовал дрожжи *Hansenula polymorpha* для выяснения роли отдельных белков-компонентов теломеразного комплекса. Следует отметить, что для проверки своих научных гипотез автором проведена большая работа, подразумевающая получение целого набора мутантных штаммов и выполнен значительный объем работы с дрожжами. Так, автором была исследована роль белков Est3 и Est1 в сборке и поддержании активности теломеразы. В результате, получены очень интересные данные, указывающие на то, что активность теломеразы практически не детектируется в отсутствие белка Est3, а связывание белка Est3 с теломеразной РНК осуществляется через

взаимодействие с белком Est1. При этом оказалось, что у *H. polymorpha* Est3 также необходим для связывания Est1 с теломеразной РНК. Важно отметить, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что имеются существенные различия в строении теломеразы *H. Polymorpha* и *S. Cerevisiae*. В целом, данные Шепелева указывают на то, что, несмотря на определенную эволюционную консервативность, у разных видов дрожжей элементы теломеразного комплекса взаимодействуют по-разному и, как следствие функционирование теломеразы имеет свои особенности.

Другим молекулярным механизмом, влияющим на функционирование белков и белковых комплексов, является их модификация посредством посттрансляционных модификаций. В своей работе Шепелев Н.М. исследовал влияние поли(АДФ-рибозил)ирования белков DKC1 и GAR1 на структуру и функционирование теломеразного комплекса человека. Было показано, что ПАРилирование улучшает связывание белков с теломеразной РНК, однако ослабляет их взаимодействие с рРНК и мяРНК. При этом важно подчеркнуть, эти данные были получены с использованием четырех различных подходов, что говорит об их высокой воспроизводимости и достоверности. Кроме того автором было показано, что в клетках с нокаутом гена *PARP1*, кодирующего белок осуществляющий ПАРилирование, активность теломеразы была существенно повышена, а снижение количества PARP1 приводило к стабилизации теломеразного комплекса. Кроме фундаментального, эти данные могут иметь и важное прикладное значение, так как на сегодняшний день существует уже три специфических ингибитора PARP1, допущенных FDA для использования в терапии некоторых видов рака. Соответственно, при назначении подобных препаратов в клинике, целесообразно учитывать новые данные, полученные автором диссертации.

Важно подчеркнуть высокий профессиональный уровень выполнения работы. Автором были использованы современные методы генетики, микробиологии, биохимии и молекулярной биологии. Эксперименты были

поставлены со всеми необходимыми контролями и достаточным количеством повторений. Выводы достоверны и основаны на результатах исследования. Цели и задачи работы достигнуты. Автореферат диссертации в полной мере отражает суть проведенного исследования.

Работа изложена на 139 страницах, содержит 31 рисунок, 3 таблицы и ссылки на 236 литературных источников, построена по стандартному плану и содержит основные разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, а также список литературы. По результатам исследований автором были опубликованы 3 статьи в высокорейтинговых научных журналах. Работа неоднократно была доложена в ходе национальных и международных научных конференций.

Несмотря на очевидные достоинства, у работы есть и ряд недостатков.

В разделе Результаты, описание в тексте результатов, представленных на рис. 26Б не соответствует данным рисунка. В тексте указывается, что сверхэкспрессия PARP1 повышала количество совыделяющихся РНК с GAR1 дикого типа, однако на рисунке соотношение количества совыделяющейся РНК для GAR дикого типа $k_{\text{шPARP1}}/k_{\text{шPARP1+сверх}}$ экспрессия было больше 2, что указывало на обратный эффект. В этой связи можно предположить, что автором допущена ошибка в названии оси ординат на графике. Следует также обратить внимание, что при такой интерпретации данные о том, что сверхэкспрессия PARP1 улучшает взаимодействие GAR1 с рРНК, не согласуются с результатами, представленными на рисунках 22,23,25. На мой взгляд было бы целесообразно прокомментировать эти различия.

В результатах диссертации содержится раздел, где описываются литературные данные о вспомогательном белке теломеразы Est3. На мой взгляд, описание этого белка стоило бы перенести в раздел Литературный обзор. Кроме того, следовало бы несколько расширить обсуждение результатов после их описания.

В результатах работы упомянуты методики, не описанные в разделе материалы и методы. Так, в материалах и методах не хватает описания клеточных линий и плазмид, использованных в работе (несмотря на то, что такой раздел присутствует (раздел 4)). Кроме того, в материалах и методах отсутствует описание получения стабильной клеточной линии с помощью лентивирусного вектора, ультрацентрифугирования через сахарозную подушку, нозерн блоттинга, а также FISH.

Не совсем понятно, почему на рис. 25А в лизатах клеток и в элюате выявляются белки с разной молекулярной массой. Может ли это быть связано с какими-либо другими пост-трансляционными модификациями DKC1-FLAG. Также, возможно, следовало бы попробовать дополнительно оценить влияние наличия FLAG эпитопа на связывание белков с РНК и эффективность ПАРилирования.

Данные рис. 24Б, где в клетках кшPARP1 выявляется PARP1, несколько не согласуются с рисунком 26А, где целевой белок не обнаружен.

Не ясно для чего на рис. 21 А,Б дана нормировка на тубулин, если речь идет об иммунопреципитации с антителами к FLAG.

В структуре выводов, на мой взгляд, указание на то, каким методом получен результат, является излишним.

Наконец, в тексте изредка встречаются ошибки и опечатки.

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 биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»

Морозов Алексей Владимирович

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.3. Молекулярная биология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32,
ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», лаборатория регуляции
внутриклеточного протеолиза
Тел.: 8 (499) 135-98-01; e-mail: Runkel@inbox.ru

Подпись сотрудника

ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН А.В. Морозова удостоверяю: