

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу МАЛЯВКО Александра Николаевича «Регуляция длины теломер дрожжей *Hansenula polymorpha*» представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Теломерные повторы играют важнейшую и многогранную роль в процессах поддержания жизнеспособности клеток и стабильности генома. Регуляцию функций теломер осуществляет фермент теломеразы, которая, в свою очередь, регулируется очень большим количеством различных факторов. Несмотря на обширные исследования, ведущиеся в данной области, часть из этих регуляторных факторов и тем более механизм их действия изучены очень мало, и полный механизм регуляции жизни клеток посредством теломерных комплексов вряд ли в ближайшем будущем будет прояснен до конца.

Осложняет задачу еще и то, что регуляция посредством теломерных комплексов присуща всем эукариотам, от дрожжей до человека. Разумеется, наиболее простой моделью для изучения процессов, связанных с теломерами и теломеразой, являются культуры дрожжей. Однако даже различные виды дрожжей обнаруживают значительное несходство в поведении теломерных комплексов, причем это касается не только дрожжей разных типов (почкующихся или делящихся), но то же обнаруживается и для разных видов одного типа (почкующихся дрожжей, например). Отсюда становится ясно, что если различия в «устройстве» различных дрожжей столь неоднозначно сказываются на механизмах регуляции теломер – то сходство этих механизмов с таковыми у человека, которое тем не менее усматривается по некоторым параметрам, еще более условно.

В связи с вышесказанным, перед автором диссертационной работы стояла сложнейшая задача – вычленив для исследования задачу, которая могла бы иметь законченное решение, и не запутаться в побочных процессах и регуляторных факторах, которые при решении этой задачи будут оказывать свое влияние. При этом сформулированная задача исследования должна быть актуальной, то есть ее решение должно внести новую и полезную информацию в этот практически неограниченный массив сведений о поведении теломер и связанных с ними регуляторных факторов.

В принципе автором эта задача была решена. После литературного обзора, который ясно показывает уровень сложности и неоднозначности материала, с которым приходится иметь дело – автор вполне конкретно сформулировал, что и зачем он собирается делать. То, что при этом приходится абстрагироваться от многих факторов, и суметь получить достоверные данные именно по тем вопросам, которые автор перед собой поставил – то есть не усложнить исследование до полной путаницы, и не слишком упростить эксперимент – это весьма сложная задача

Итак, в качестве объекта автором были выбраны почкующиеся дрожжи *Hansenula polymorpha*, про которые известно, что они по свойствам теломеразного комплекса значительно отличаются от наиболее изученных *S.cerevisiae*. При этом некоторые уникальные свойства объекта пока не подвергались подробному исследованию, что позволило обеспечить работе необходимую новизну.

К сожалению, в этом месте автору приходится сделать замечание. Выбор объекта в конечном итоге обоснован недостаточно. Во-первых, в подробнейшем литературном обзоре, где перечислено множество видов дрожжей – планируемый объект исследования практически не упоминается, то есть его место в схемах, иллюстрирующих модели регуляции как для почкующихся, так и для делящихся дрожжей – в литобзоре вообще осталось неизвестным. Это определенным образом компенсируется параграфом 3.1 в Результаты («Постановка задачи»), где объект исследования более или менее описан. Но даже и по прочтении этого параграфа остаются вопросы: неясно, были ли до данной работы (и кем) установлены факты, на которых основывается исследование, а именно то, что они обладают самыми короткими теломерами, последовательность нуклеотидов в теломерных повторах, и даже тот факт, что они являются термостабильными. Так и осталось не до конца ясным – эти исходные для исследования параметры являются литературными данными, или получены в лаборатории соискателем и его коллегами, либо впервые обнаружены самим диссертантом. А ведь именно эти факты – уникально короткие теломеры (что заставляет предполагать и некоторые уникальные черты регуляторного механизма), удобство работы, связанное с термостойкостью, и т.п. – и явились основой для выбора объекта.

Первая часть исследования собственно и заключается в выяснении роли этого дополнительного нуклеотида, его расположения (только в 3'-концевых повторах), и убедительном доказательстве того, что именно эта особенность и ответственна в основном за то, что теломеры у выбранного объекта самые короткие. При помощи высокопроизводительного секвенирования, отбора полноразмерных ридов и анализа их 3'-концевых последовательностей автором достоверно показано, что, такой дополнительный нуклеотид dT содержат во всяком случае более 90% теломер в клетке, а с учетом случайных погрешностей (недорепликация, деградация) можно достоверно предположить, что это свойственно *каждому* концевому повтору. Насколько я понимаю, этот механизм ограничения длины теломер (а далее автором показано, что работает именно этот механизм) был ранее не описан.

К чести автора, работая со столь сложной системой, он на каждой стадии исследования четко формулирует гипотезу и вопросы, на которые следует получить ответ. Так, с целью изучения значения обратной транскрипции A170 были получены мутантные формы с заменами 170 остатка на другие три нуклеотида. При этом выяснилось, что замена 170A на U и G приводила к аналогичному эффекту (короткие теломеры), в то время как замена 170C имела совершенно иные последствия, а именно заметное удлинение и увеличение гетерогенности теломерных последовательностей. Далее автором ставится вопрос – каким образом? И убедительно показано, что в случае замены 170A-170C на 3'-конец теломеры присоединяется остаток G, который собственно и должен находиться в этом месте повтора, и «все встает на свои места».

Автор не упускает из виду и обсуждение возможных альтернативных объяснений данному факту, а именно снижения эффективности включения дополнительного нуклеотида. Правда, осталось несколько непонятным, почему для ответа на этот вопрос автор не пользуется уже испытанным способом высокопроизводительного секвенирования и отбора ридов. (Возможно, этот способ оказывается слишком трудоемким). Примененный автором подход, хотя и оказался вполне результативным, но вызывает некоторые затруднения в понимании. Нигде ранее ничего не сказано относительно роли мутации в положении 178: это ноу-хау автора, или роль этого остатка уже была ранее установлена? Когда и кем? Ссылки или других пояснений нет ни в автореферате, ни в диссертации.

Как указывает сам автор, к сожалению исследование полученных мутантов не может дать исчерпывающего объяснения нарушению регуляции теломер, так как возможны и другие сценарии, в частности в зависимости от фазы клеточного цикла и

т.д. Однако в любом случае это свойство теломеразы *Hansenula polymorpha* впервые обнаружено и описано диссертантом и вносит заметный вклад в исследование сложнейшей системы регуляции теломеразных комплексов, изучения которой хватит еще на много диссертаций.

Следующий вопрос, на который попытался ответить автор – работают ли в *Hansenula polymorpha* механизмы регуляции длины теломер обнаруженные в других организмах, в частности в дрожжах *S.cerevisiae*, изученных более других видов. Поскольку именно эта изученность привела к тому, что известно множество генов белков, которые так или иначе, более или менее понятными способами, вносят вклад в процессы регуляции теломерных комплексов – автор исследовал роль последовательностей в *Hansenula polymorpha*, которые гомологичны соответствующим белкам-регуляторам *S.cerevisiae*. Однако белки, роль которых исследовалась путем создания соответствующих нокаутных штаммов, в большинстве случаев (за исключением Rif1) оказались не аналогичны по своей роли белкам из *S.cerevisiae*.

Таким образом, ценой большого числа трудоемких экспериментов, автору не удалось подтвердить общность механизмов регуляции теломераз, даже на относительно близких (почкующиеся дрожжи) объектах. Это лишь иллюстрирует сложность изучаемой тематики и тот факт, что существующие на настоящий момент концепции и гипотезы не являются исчерпывающими, и даже остаются в некоторых аспектах противоречивыми.

В заслугу автору можно поставить тот факт, что в части несовпадения его результатов с рядом общепринятых концепций он не только не отказывался от своих результатов, но во всех случаях предпринимал попытки объяснить и показать, что вопрос не в ошибке автора или концепции, а в сложности и неоднозначности самой системы регуляции.

Таким образом, в диссертации поставлена неординарная задача – изучение ряда аспектов сложнейшего (и не до конца понятного) регуляторного механизма. Задачу автор решил с честью, не «увязнув» в излишних экспериментах, четко ставя вопросы и получая на них ответы.

Из недостатков работы, помимо уже отмеченных выше, можно упомянуть отсутствие информации в экспериментальной части о происхождении используемых в работе олигонуклеотидов. Несколько парадоксально звучит фраза «на примере делящихся дрожжей и человека было показано...» Собственно, ничего криминального в этой фразе нет, но поскольку дрожжи, в отличие от человека, все-таки одноклеточные

объекты – при прочтении возникают неудобные ассоциации, связанные с извлечением ДНК из человека как дискретного объекта. Утверждение (в нескольких местах), что dT находится «на самом 3'-конце» теломеры излишне эмоционально. Если нуклеотид находится на 3'-конце – так очевидно, что «на самом», а не на каком-то еще.

В целом можно сказать, что работа посвящена очень сложной тематике и выполнена с честью. Получены новые данные, вносящие вклад в понимание механизмов регуляции теломераз. Выводы работы соответствуют результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации. Диссертационная работа МАЛЯВКО А.Н. полностью соответствует требованиям к кандидатским диссертациям, изложенным в пунктах 9-14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» (№ 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор безусловно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Д.х.н.

ТУНИЦКАЯ В.Л.

Ведущий научный сотрудник

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии
наук (ИМБ РАН)

Москва 119991, ул. Вавилова, д. 32.

Тел. (499)135-05-90

Ve_tun@mail.ru

