



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

28.11.14

№ 103-217.1-994

на №

от



УТВЕРЖДАЮ

директор ИБХ РАН
академик Иванов В.Т.

" " ноября 2014

О Т З Ы В

ведущей организации – ФГБУН Института Биоорганической Химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН – 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

Изучение аспектов функционирования теломер, безусловно, является важной и актуальной задачей в современном мире. Ведь именно они играют одну из ключевых ролей в процессах клеточного старения и перерождения нормальных клеток в злокачественные. При этом изменение длины теломер влияет на эти два процесса противоположным образом – в то время как удлинение теломер должно замедлять процессы старения клеток, оно одновременно повышает риск возникновения раковых опухолей. Поэтому перед исследователями стоит задача научиться свободно управлять длиной теломер, вероятно путём воздействия на теломеразу – фермента, отвечающего за синтез теломерной ДНК в клетке. Для этого необходимо тщательное изучение механизма работы теломеразы и факторов, её регулирующих.

Несмотря на стремительное развитие методов исследований, работа с культурами клеток человека по-прежнему остаётся трудной задачей. И использование одноклеточных эукариотических организмов в качестве модельных для изучения функций теломер и теломеразы является логичным решением проблемы. Однако полученные за последние десятилетия данные указывают на большое разнообразие деталей регуляции синтеза теломерной ДНК у различных организмов. В связи с этим использования большего числа различных моделей для определения консервативности тех или иных черт контроля длины

теломер является одним из возможных выходов из ситуации.

Диссертационная работа Малявко А.Н. направлена на изучение теломеразы и теломер с использованием нового модельного организма – термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha*. Предпосылкой данной работы стала интересная особенность теломеразной активности, выделенной из этого организма: включение *in vitro* дополнительного нуклеотида, не обнаруженного ранее в теломерных последовательностях. В работе Малявко А.Н. впервые показано, что дополнительный нуклеотид встречается в теломерах *H. polymorpha* причём только в составе последнего теломерного повтора. Также получены экспериментальные доказательства тому, что добавление дополнительного нуклеотида является фактором, ограничивающим длину теломер в этом виде дрожжей. Более того, в работе проведён сравнительный анализ влияния на длину теломер *H. polymorpha* белков, задействованных в регуляции длины теломер дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В результате оказалось, что контроль длины теломер этих двух видов дрожжей существенно различен.

Работа изложена на 100 страницах, содержит 5 таблиц и 34 рисунка, список литературы включает 187 цитированных работ. Основные результаты работы представлены и апробированы на 3 научных конференциях и опубликованы в виде 3 статей в рецензируемых журналах. Автореферат включает основные положения, выносимые на защиту.

Диссертация Малявко А.Н. построена традиционным образом и состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, материалов и методов, выводов и списка литературы.

Во введении описана фундаментальная проблема, которой посвящена диссертационная работа, обоснованы актуальность и новизна исследований, сформулирована цель работы.

В обзоре литературы «Регуляция длины теломер» описаны основные механизмы, обеспечивающие контроль длины теломер различных организмов: четырёх видов почкующихся дрожжей, делящихся дрожжей, а также человека. Несмотря на большую разнородность имеющихся данных, автору удалось изложить материал в удобном для восприятия виде. В процессе рассмотрения различных систем регуляции автор пытается сравнивать детали механизмов, что позволяет делать интересные выводы о консервативности тех или иных факторов гомеостаза теломер. Основные результаты такого сравнительного анализа суммированы в заключении к обзору.

В разделе "Результаты и обсуждение" автором чётко формулируются задачи, выполнение которых необходимо для достижения цели данной диссертационной работы – изучения регуляции длины теломер *H. polymorpha*. Первой задачей явилось подтверждение того, что теломераза *H. polymorpha* встраивает дополнительный dT нуклеотид *in vivo*, ведь ранее такое встраивание наблюдали только *in vitro*. Для этого автором было получено большое число теломерных последовательностей при помощи высокопроизводительного секвенирования, и

подавляющее большинство полученных последовательностей содержало искомый нуклеотид в составе последнего теломерного повтора. Далее автор путём мутагенеза матричного участка теломеразной РНК и анализа длины теломер показал, что встраивание дополнительного нуклеотида ограничивает возможность теломеразы синтезировать теломерную ДНК. Более того, показано, что причиной этому является нарушение способности репозиционировать субстрат в начало матричного участка при добавлении дополнительного нуклеотида. Важно отметить, что автор критически подходит к анализу получаемых данных и рассматривает альтернативные интерпретации результатов. Также автор рассматривает возможные механизмы контроля теломерной длины с учётом полученных результатов.

Поскольку описанный в данной работе способ ограничения активности теломеразы изучаемых термотолерантных дрожжей не имеет аналогов в других организмах, то особенно логичной становится другая задача, поставленная автором: проверка существования в *H. polymorpha* механизмов контроля теломеразы, описанных для наиболее изученных почкующихся дрожжей – *S. cerevisiae*. Для этого автор идентифицировал в *H. polymorpha* белки, гомологичные основным регуляторам длины теломер *S. cerevisiae*. Уже на этом уровне обнаружились некоторые отличия: из выбранных пяти белков *S. cerevisiae* одного (*Rif2*) в геноме *H. polymorpha* не оказалось, а ген другого (*Rap1*) оказался дублицирован. Более того, только один из проанализированных белков (*Rif1*) задействован в регуляции длины теломер *H. polymorpha*. Но механизм действия *Rif1* должен отличаться от описанного в литературе: ведь С-концевые домены белков *Rap1* не влияют на длину теломер *H. polymorpha*, а именно они ответственны за привлечение *Rif1* на теломерную ДНК. При этом оба гомолога белка *Rap1* являются компонентами теломерного хроматина *H. polymorpha*, как показано методом иммунопреципитации хроматина. И снова стоит отметить, что автор предлагает разумные объяснения противоречивым результатам и предлагает возможные механизмы регуляции теломеразы белком *Rif1*.

В разделе "Материалы и методы" достаточно подробно и исчерпывающе описаны использованные экспериментальные процедуры. Создание большого количества разнообразных штаммов нестандартного организма *H. polymorpha* (штаммы с мутациями в гене теломеразной РНК, нокаутные штаммы, штаммы с тагированными белками) говорит о высоком методическом уровне работы и высокой квалификации соискателя.

Работа представляет собой систематическое, вполне законченное исследование. Материал диссертации изложен последовательно, ясно и логично. Используемые в работе экспериментальные методы обоснованы и приняты в практике научных исследований. Результаты опытов достоверны, научные положения и сформулированные выводы, изложенные в диссертации, вытекают из экспериментальных данных. В рамках общих

требований к оформлению диссертации приятно отметить, что диссертация написана ясным научным языком и хорошо оформлена.

По представленной диссертационной работе необходимо сделать следующие замечания. 1) При получении ПЦР продуктов, содержащих теломерные последовательности *H. polymorpha*, образуется побочный продукт в значительном количестве, однако автор нигде не описывает возможную природу этого продукта. 2) При описании самого же метода ПЦР теломер автор упоминает о некой модификации: «ПЦР проводили по методике, успешно применяемой ранее для получения последовательностей теломер в других организмах [172], с небольшой модификацией», но что это за модификация автор не указывает. 3) В тексте есть некоторые неудачные выражения и жаргонные термины. Например «стр. 52, 3-ой абзац: «Удлинение теломер будет происходить до тех пор, пока одна из теломераз не добавит dT», видимо, имелось ввиду «одна из молекул теломеразы». Также вместо термина «рид» следовало бы использовать термин «прочтение».

Перечисленные замечания не являются принципиальными, носят скорее рекомендательный характер и не ставят под сомнение основные результаты, фундаментальную и практическую значимость работы.

Содержание материалов диссертационной работы достаточно полно отражено в публикациях Малявко А.Н. Выводы обоснованы и хорошо проиллюстрированы материалами автореферата. Автореферат отражает основное содержание диссертации. В целом, диссертационная работа Малявко А.Н. представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение важной фундаментальной задачи, связанной с функционированием теломер и теломеразы *H. polymorpha*. Полученные данные представляют интерес для исследований, связанных с изучением механизмов регуляции длины теломер эукариот и могут быть использованы в институтах академического профиля – Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки: Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Институте биохимии имени А.Н. Баха, Институте белка РАН, Институте биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН и др., а также для биомедицинских исследований, направленных, например, на поиск и разработку новых ингибиторов теломеразы.

Представленная работа полностью соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. А именно, в диссертации впервые продемонстрированы многие особенности регуляции длины теломер термотолерантных дрожжей *H. polymorpha*, и получены важные результаты, необходимые для развития современной биоорганической

химии. Автор диссертационной работы Малявко Александр Николаевич несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Отзыв на диссертационную работу Малявко Александра Николаевича заслушан и утвержден на заседании Группы мембранных биоэнергетических систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института Биорганической Химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН 13 ноября 2014 г., протокол № 21.

Руководитель группы мембранных биоэнергетических систем

Федерального государственного

бюджетного учреждения науки

Института Биорганической Химии

имени академиков М.М. Шемякина

и Ю.А. Овчинникова РАН,

д.х.н., профессор

Шахпаронов М.И.

Подпись М.И. Шахпаронова заверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН д.ф.-м.наук



В.А.Олейников