



Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,  
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: [isinfo@eimb.ru](mailto:isinfo@eimb.ru)  
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

№ \_\_\_\_\_  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
Академик

А.А. Макаров



« 3 » февр. 2015 г.

**О Т З Ы В**

ведущей организации о диссертационной работе Ажибека Дулата Мейирбековича  
«Ингибирование теломеразы человека», представленной на соискание ученой  
степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая  
химия

Изучение возможностей блокирования работы теломеразы, безусловно, является актуальной задачей в современном мире в свете потенциальной разработки целевых препаратов для противоопухолевой терапии. Теломераза активируется для компенсации укорочения теломер и приобретения клеткой неограниченного пролиферативного потенциала в процессе перерождения соматических клеток в злокачественные в более чем у 85% типов клеток.

Диссертационная работа Ажибека Д.М. направлена на изучение теломеразы человека и разработки новых способов специфического выключения этого фермента.

Работа изложена на 142 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы, которые расположены в работе традиционным образом: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, материалы и методы, выводы, список литературы и приложение. Материал иллюстрирован 40 рисунками и 9 таблицами. Библиографический указатель включает 173 цитированные работы.

Основные результаты работы представлены и апробированы на научных конференциях и опубликованы в виде 4 полноразмерных статей в рецензируемых журналах. Автореферат включает основные положения, выносимые на защиту.

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

В обзоре литературы описаны основные способы воздействия на теломеразу. Несмотря на большое количество имеющихся данных, автору удалось изложить материал в доступном для восприятия виде. Особое внимание уделено возможности использования олигонуклеотидов для влияния на работу теломеразы.

В разделе "Результаты и обсуждение" автором чётко формулируются задачи, выполнение которых необходимо для достижения цели данной диссертационной работы – дизайна новых химерных ингибиторов теломеразы олигонуклеотидной природы, изучение влияния их структуры на ингибирующую способность и определение стадии биогенеза или работы теломеразы, подвергающейся ингибированию. Первой задачей необходимо было разработать адекватную систему для детекции ингибирования теломеразы олигонуклеотидами. Такой метод был разработан. Для этого широко известный метод измерения теломеразной активности под аббревиатурой ТРАП (telomere repeat amplification protocol - trap) был оптимизирован для количественного измерения и скрининга потенциальных ингибиторов теломеразы различной природы. Основным достижением в разработке метода было решение проблемы влияния исследуемых веществ на полимеразную цепную реакцию, которая используется для усиления сигнала при измерении теломеразной активности. Метод был использован автором диссертационной работы для оценки ингибирующей способности различных низкомолекулярных соединений и олигонуклеотидов. Показана применимость метода для веществ, стабилизирующих альтернативные структуры ДНК и ингибирующих полимеразную цепную реакцию. Проиллюстрирована необходимость подтверждения способности ингибировать теломеразу альтернативным методом измерения теломеразной активности.

Использование низкомолекулярных веществ и олигонуклеотидов для ингибирования теломеразы ранее уже было описано. Новизна подхода, реализованного в диссертационной работе, состоит в применении химерных бифункциональных олигонуклеотидов, которые содержат две олигонуклеотидных части, комплементарных функциональными доменами теломеразной РНК и которые связаны друг с другом нуклеотидным линкером в различных ориентациях ( 5'- 3 ' , 5' - 5 ' или 3'- 3 ' ).

Предполагалось, что такие химеры будут работать как скрепка, блокируя возможность изменения взаиморасположения доменов теломеразной РНК в процессе работы комплекса. При тестировании олигонуклеотидов хорошую способность ингибировать теломеразу в клетке проявили химерные олигонуклеотиды, состоящие из двух последовательностей, комплементарных одному району теломеразной РНК, и соединенных не-нуклеотидным линкером, что подтверждает, что теломераза человека – это димер. Это фундаментальное свойство теломеразы человека в дальнейшем может быть использовано для разработки более эффективных и селективных ингибиторов теломеразы.

В работе показано, что химерные олигонуклеотиды влияют на работу теломеразы в системе *in vitro* и снижают теломеразную активность экстрактов клеток, которые культивировали в присутствии химерных олигонуклеотидов. Для наиболее активных химер было показано, что они эффективно блокируют сборку активного теломеразного комплекса в клетке. Таким образом, экспериментально продемонстрирована эффективность подхода к ингибированию теломеразы за счет блокирования сборки активного комплекса. Такой подход может стать основой для разработки новых более эффективных противоопухолевых препаратов. Так, способность ингибировать теломеразу в клетке наиболее эффективного химерного олигонуклеотида превышает такую способность для олигонуклеотида с последовательностью препарата Иметелстата более чем на порядок.

В разделе "Материалы и методы" достаточно подробно описаны использованные экспериментальные процедуры и приведены таблицы с последовательностями олигонуклеотидов и составов растворов. Работа представляет собой 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.

По представленной диссертационной работе необходимо сделать следующие замечания: 1) Диссертация содержит в себе раздел «Приложение», в котором представлены кривые изменения теломеразной активности, а также выхода полимеразной цепной реакции от использованной концентрации тестируемого вещества. На основании этих данных рассчитывали концентрацию вещества, при которой происходит падение теломеразной активности в два раза ( $IC_{50}$ ) и степень разведения смеси для исключения ингибирования ПЦР. Похвально, что эти графики приведены, но представление

материала реализовано неудачно. Приложение содержит три главы, первая и вторая посвящены ингибированию олигонуклеотидами, третья –низкомолекулярными веществами. В диссертационной работе порядок появления соответствующих  $IC_{50}$  обратный. У приложений отсутствуют названия, а подпись к графикам идет в конце каждого приложения, что еще больше затрудняет восприятие данных. 2)  $IC_{50}$  - это основной параметр, по которому идет сравнение соединений между собой по способности ингибировать теломеразную активность. В работе отсутствует формула, по которой происходил расчет этого параметра. Фраза, что для этого была использована программа с соответствующей встроенной функцией анализа графиков, описывает процесс, осуществленный диссертантом, но недостаточна. 3). Присутствует небрежность в оформлении, выраженная в пренебрежении к деталям. К примеру, в работе был модифицирован метод амплификации теломерных повторов, для которого в начале работы введено сокращение ТРАП, почему иногда встречается английский вариант написания этого сокращения (Таблица 1)? Зачем надо было вводить сокращение слова теломеразы как тел-за на рисунке 3? Почему одно и тоже название клеточной линии на стр.69 написано обычным шрифтом, а на стр.79 с наклоном? Использование точки при сокращении слов иногда кажется автором излишним.

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 Ажибека Дулата Мейирбековича. Выводы обоснованы и хорошо проиллюстрированы материалами автореферата. Автореферат отражает основное содержание диссертации. В целом, диссертационная работа Ажибека Д.М. представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение важной фундаментальной задачи, связанной с функционированием теломеразы. 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.

В диссертации впервые продемонстрирована система экспрессии основных компонентов теломеразного комплекса человека, которая позволяет повысить уровень теломеразы в клетках НЕК293Е по сравнению с описанным ранее. Разработанный метод количественного определения теломеразной активности позволяет измерять ингибирование теломеразы веществами, влияющими на ПЦР, и с помощью этого метода охарактеризованы новые соединения - ингибиторы теломеразы. Основным результатом работы является демонстрация подхода к ингибированию теломеразы на уровне блокирования сборки теломеразного комплекса при использовании химерных олигонуклеотидов, состоящих из двух частей, комплиментарных разным районам hTR и соединенных нуклеотидным линкером. Использование химерных олигонуклеотидов с одинаковой последовательностью олигонуклеотидных частей подтвердило димеризацию теломеразы человека. Таким образом, получены важные результаты, необходимые для развития современной биоорганической химии. 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. Автор диссертационной работы Ажибек Дулат Мейирбекович несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Отзыв на диссертационную работу Ажибека Дулата Мейирбековича заслушан и одобрен на заседании Лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук 27 января 2015 г., протокол № 2.

Зав. лабораторией регуляции внутриклеточного протеолиза  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,  
д.б.н., профессор



Карпов В.Л.

Подпись Карпова В.Л. удостоверяю

Ученый секретарь Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,



Крицын А.М.