

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Петрова Ольга Алексеевна

**Структурные исследования компонентов теломеразного
комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha***

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия
03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в отделе структуры и функций РНК Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ

**Научные
руководители**

- **Донцова Ольга Анатольевна**, доктор химических наук, профессор, академик РАН, Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова.
- **Зверева Мария Эмильевна**, кандидат химических наук, доцент, Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова.

**Официальные
оппоненты**

- **Смирнов Иван Витальевич**, доктор химических наук, Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, группа комбинаторных методов конструирования биокатализаторов, главный научный сотрудник.
- **Демидкина Татьяна Викторовна**, доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией химических основ биокатализа ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН.
- **Усачев Константин Сергеевич**, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ Структурная Биология Института фундаментальной медицины и биологии Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Защита диссертации состоится «22» мая 2018 г. в 17:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: sig@genebee.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/107333926/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент

Смирнова И. Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Концы линейных хромосом эукариотических организмов состоят из специализированных ДНК-белковых структур, называемых теломеры. Согласно классическому механизму репликации, при каждом клеточном делении концы теломер укорачиваются.

Основным механизмом поддержания длины теломер является активация теломеразы. Теломераза представляет собой сложный комплекс, включающий обратную транскриптазу, которая участвует в поддержании стабильности генома, синтезируя повторяющиеся теломерные последовательности на концах эукариотических хромосом по РНК матрице, входящей в состав теломеразного комплекса. В норме теломераза не активна в большинстве соматических клеток, однако активность теломеразы детектируется во всех клетках с высоким пролиферативным потенциалом, например, стволовых, половых и зародышевых, а также у одноклеточных эукариот. С другой стороны, теломераза также отвечает за неограниченное деление клеток практически во всех типах раковых образований. С этим связано всё возрастающее внимание к пониманию структуры и механизмов работы теломеразы, так как теломераза является перспективной мишенью в противораковой терапии.

Основными компонентами теломеразного комплекса являются теломеразная обратная транскриптаза, каталитическая субъединица (TERT или Est2 в дрожжах) и теломеразная РНК, содержащая матричный участок, комплементарный последовательности теломерного повтора (TER или TLC1 в дрожжах). Этих двух компонентов достаточно для активности теломеразы *in vitro*, однако в клетке, для поддержания длины теломер требуются дополнительные белковые компоненты, необходимые для сборки, локализации и активности теломеразы *in vivo*, например, в дрожжах это белки Est1 и Est3.

Для создания инструментов, позволяющих управлять селективностью теломеразы, необходимо понимание работы всех её компонентов на молекулярном уровне. Структурные исследования теломеразы различных модельных организмов позволят расширить знания о пространственной организации и функционировании фермента, а также выявить консервативные, то есть наиболее значимые аспекты механизма его работы. Однако, изучение теломеразы сильно ограничено ввиду её низкого содержания в клетках, сложного механизма сборки и очень низкой стабильности её компонентов. Для теломеразного комплекса человека, информация о

структуре ограничивается данными электронной микроскопии с разрешением 23Å. В единственной существующей на данный момент кристаллической структуре каталитической субъединицы TERT жука *Tribolium castaneum* не достаёт характерного для теломеразных обратных транскриптаз N-концевого домена, который является независимым и обладает отдельными функциями в работе фермента.

Все опубликованные на настоящий момент модели TEN домена теломеразы человека смоделированы на основе единственной существующей кристаллической структуры N-концевого домена TERT теломеразы *Tetrahymena thermophila*. Однако анализ аминокислотной последовательности показывает, что степень гомологии последовательности TEN реснитчатых значительно ниже последовательностей TEN других видов, включая млекопитающих и дрожжи. Таким образом, структура высокого разрешения TEN из любого другого организма, кроме реснитчатых, будет гораздо более подходящей матрицей для моделирования структуры TEN домена теломеразы человека. Кроме того, такая информация сможет показать структурную гомологию среди TEN доменов разных классов, ввиду низкой гомологии в аминокислотных последовательностях. Всё это делает изучение структуры белковых компонентов теломеразы дрожжей важной и актуальной задачей.

Известно, что белки и их комплексы из термостабильных организмов обычно более стабильны, что облегчает их получение и работу с ними *in vitro*. В нашей лаборатории для изучения теломер и теломеразы была разработана система, созданная на основе термотолерантных почкующихся дрожжей *Ogataea polymorpha* (*Hansenula polymorpha*).

Hansenula polymorpha – это метилотрофные почкующиеся дрожжи, широко используемые в исследованиях метаболизма метанола, функций и биогенеза пероксисом, а также для суперэкспрессии рекомбинантных белков. На данный момент опубликован как ядерный, так и митохондриальный геном разных штаммов дрожжей *H.polymorpha*. Дрожжи *H.polymorpha* термотолерантны, некоторые штаммы этих почкующихся дрожжей способны выживать при температурах до 50°C и даже выше. Всё это делает дрожжи *H.polymorpha* прекрасным модельным организмом для изучения структурных особенностей компонентов теломеразного комплекса.

В нашей лаборатории были идентифицированы основные компоненты теломеразного комплекса дрожжей *H.polymorpha*: теломеразная РНК (hpTER) и каталитическая субъединица hpTERT. Как и TERT других организмов, TERT дрожжей *H.polymorpha* также обладает доменной структурой. Однако, низкая

стабильность полноразмерной каталитической субъединицы, её склонность к агрегации в растворе и низкий уровень экспрессии в клетках затрудняют изучение структуры hpTERT. В связи с этим было принято решение использовать альтернативный подход к определению её структуры, а именно определить границы доменов hpTERT, экспрессировать и очистить полученные домены для дальнейших структурных исследований.

Кроме того, в нашей лаборатории были получены некоторые данные о дополнительных компонентах теломеразы, белке hpEst3, сведения о структуре белка Est3 ограничены лишь одной моделью, полученной для белка дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для scEst3 была показана структурная гомология с белками теломер TPP1 человека и ТЕВРβ реснитчатых *Oxytricha nova*. Таким образом, структура белка Est3 из другого модельного организма поможет выявить консервативные именно для дрожжей структурные элементы и элементы, консервативные для всех видов, включая человека и позволит понять эволюцию этих белков.

Цель работы:

получение структурных данных о компонентах теломеразного комплекса дрожжей *H.polymorpha*.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Биоинформатический поиск и экспериментальное подтверждение генов-кандидатов дополнительных белковых компонентов теломеразы дрожжей *H.polymorpha* Est1 и Est3.
2. Разработка метода получения рекомбинантных белков hpEst1 и hpEst3.
3. Структурные исследования полученного рекомбинантного белка hpEst3 методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР).
4. Поиск границ доменов каталитической субъединицы дрожжей *H.polymorpha* (hpTERT).
5. Разработка метода получения рекомбинантных доменов hpTERT.
6. Структурные исследования N-концевого домена hpTERT (hpTEN) методами кристаллографии и спектроскопии ЯМР.
7. Функциональные исследования hpTEN, создание модели функционирования hpTERT и предположительная роль hpTEN в работе фермента.

Новизна и практическая значимость работы.

В данной работе были получены данные о генах, кодирующих дополнительные белковые компоненты теломеразы дрожжей *H.polymorpha* Est1 и Est3, идентифицированных на основании биоинформатического анализа и

экспериментального подтверждения *in vivo*. Были созданы конструкции для получения рекомбинантных белков hpEst1 и hpEst3. Рекомбинантный белок hpEst1 отсутствовал в растворимой фракции, однако рекомбинантный белок hpEst3 оказался хорошо растворим и стабилен в растворе. Полученный белок был охарактеризован физико-химическими методами: спектроскопией кругового дихроизма, термофлюориметрии и динамическим светорассеянием.

Для регуляторного белка hpEst3 были получены замещённые производные, содержащие ^{15}N или $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$. Совместно с Лабораторией магнитной томографии и спектроскопии, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (Польшаков В.И.) были сняты спектры ЯМР и сделано отнесение сигналов, что позволило решить структуру этого белка в растворе. Полученная структура hpEst3 обладала высокой степенью структурной гомологии с ранее полученной структурой Est3 *S.cerevisiae* (scEst3) и с OB-fold теломерных белков TPP1 человека и ТЕВР β реснитчатых *O.nova* (укладка OB-fold – Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding Fold, характерная для олигонуклеотид-/олигосахаридсвязывающих белков). hTPP1, как и гетеродимер OnТЕВР α/β , входит в состав теломерного комплекса, в то время как Est3 является компонентом теломеразы. Однако структурное сходство белков Est3, TPP1 и ТЕВР β может указывать на их эволюционную связь.

Таким образом, полученная структура hpEst3 дала новую информацию об особенностях структуры Est3 в дрожжах, позволила выявить элементы, консервативные именно для дрожжей, а также элементы, консервативные для всех видов, включая человека.

Кроме того, в данной работе был проведён поиск функциональных доменов hpTERT, подходящих для структурных исследований. В результате была определена и охарактеризована физико-химическими методами стабильный N-концевой домен hpTERT. Представлены структуры TEN-домена hpTERT: в кристалле, полученная методом рентгеновской кристаллографии, и в растворе, полученная с использованием спектроскопии ЯМР. Представленное структурное сравнение, вместе с анализом множественных выравниваний последовательностей на основе полученной структуры, позволило определить эволюционно консервативные структурные элементы, которые могут быть важны для функции TEN домена. Основываясь на локальных структурных различиях между проанализированными структурами, можно считать, что hpTEN превосходно подходит для моделирования TEN домена человека.

Охарактеризовано взаимодействие hpTEN с нуклеиновыми кислотами, моделирующими участки теломеразной РНК, теломер и их комплекса. На основании

полученных данных была предложена модель hpTERT. Согласно этой модели hpTEN может ограничивать размер длины гетеродуплекса между матричным участком TER и теломерной ДНК при синтезе повтора, что облегчает разделение цепей, необходимое для транслокации РНК и процессивности при добавлении теломерных повторов. hpTEN представляет собой стерический барьер аналогично РНК полимеразе II и бактериальным РНК полимеразам.

Апробация работы.

Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, 18-22 сентября 2017; 11-я Международная конференция Биокатализ-2017, Москва, Россия, 25-30 июня 2017; AMPERE NMR School, Закопане, Польша, 25 июня - 30 июля 2017; IX International Voevodsky Conference «Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes», Akademgorodok, Novosibirsk, Россия, 25-30 июня 2017; Telomeres and telomerase, Cold Spring Harbor, NY, США, 2-6 мая 2017.

Структура и объём работы.

Диссертационная работа изложена на 166 страницах машинописного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, результаты и их обсуждение, выводы, материалы и методы, список литературы и приложение. Работа содержит 52 рисунка и 2 таблицы. Библиографический указатель включает 164 процитированные работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Идентификация генов дополнительных белковых компонентов теломеразы дрожжей *H.polyomorpha*

Биоинформатическая идентификация генов дополнительных белковых компонентов теломеразы hpEst1 и hpEst3

Для идентификации гена белка Est1 теломеразного комплекса дрожжей *H. polyomorpha* (hpEst1) был проведен сравнительный анализ генома данного организма с известными гомологами Est1. При помощи программы BLAST, ген белка Est1 *S.cerevisiae* сравнили с геномом *H.polyomorpha*. Длина открытой рамки считывания полученного белка-кандидата составила 764 аминокислотных остатка, предсказанная масса - 88,2кДа. Полученный белок-кандидат обладал доменным составом, характерным для Est1 белков. Он содержал Est1 домен, ДНК/РНК связывающий домен (DNA Binding Domain – DBD), а также тетратрикопептидные повторы (TetraTricopeptide Repeat – TPR). Сравнение аминокислотного состава белка-кандидата Est1 из *H.polyomorpha* с известными белками Est1 различных дрожжей

показало высокую степень гомологии, особенно в областях расположения доменов, характерных для Est1.

Поиск гена белка hpEst3 проводили аналогичным образом. При помощи программы BLAST ген белка Est3 *S. cerevisiae* сравнили с геномом *H. polymorpha*. Затем нами был проведён дополнительный расширенный анализ последовательностей генов белков Est3. Длина открытой рамки считывания белка-кандидата Est3 *H. polymorpha* составила 175 аминокислотных остатка, предсказанная масса - 20,27кДа. Полученный белок-кандидат обладал характерным для всех Est3 белков доменом, названным TPP1 домен.

Экспериментальное подтверждение взаимосвязи генов-кандидатов белков hpEst1 и hpEst3 и системы поддержания длины теломер

Для подтверждения того, что идентифицированные биоинформатически гены действительно являются генами белков теломеразного комплекса Est1 и Est3, было необходимо показать, во-первых, наличие сенесценс фенотипа в дрожжах с удалённым геном Est1 или Est3. Во-вторых, укорочение теломер в ряду поколений в дрожжах с удалённым геном Est1 или Est3. Для этого нами были созданы штаммы дрожжей *H. polymorpha* с нокаутом генов-кандидатов, в котором проверяли длину теломер методом анализа длины рестрикционных фрагментов теломер с помощью Саузерн-блот анализа и наличие сенесценс фенотипа методом разведения на чашках Петри (Рисунок 1, 2).

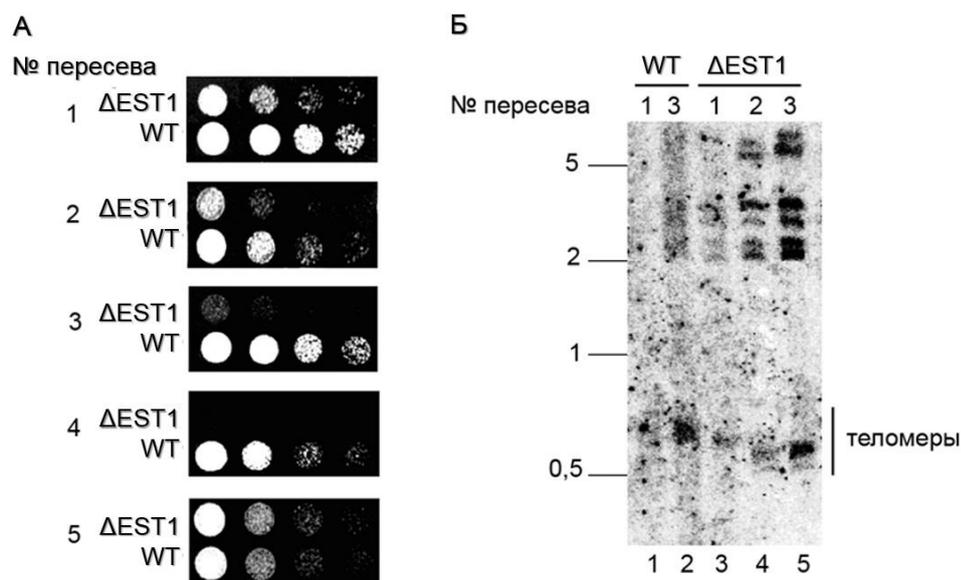


Рисунок 1.

Подтверждение взаимосвязи идентифицированного гена-кандидата Est1 *H. polymorpha* с биогенезом теломер. Удаление идентифицированного гена приводит к сенесценс-фенотипу

и укорочению теломер в дрожжах. **А** – нокаут гена приводит к потере жизнеспособности штамма дрожжей при делении клеток. ΔEST1 - нокаут гена белка hpEst1, WT – штамм дикого типа. Четыре точки в одном пересеве соответствуют последовательным разведениям одной культуры. **Б** – анализ длины рестрикционных

фрагментов теломер в штамме с удалённым геном-кандидатом *Est1* и в штамме дикого типа методом Саузерн блот анализа.

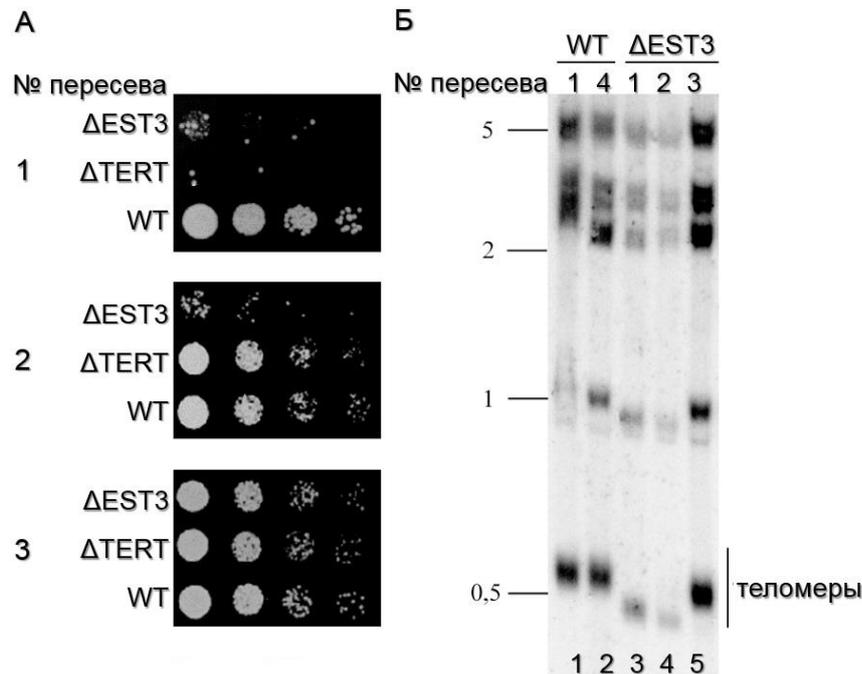


Рисунок 2. Подтверждение взаимосвязи идентифицированного гена-кандидата *Est3* *H. polymorpha* с биогенезом теломер. Нокаут гена *Est3* приводит к сенесценс-фенотипу и укорочению теломер в дрожжах. **А** – нокаут гена приводит к потере жизнеспособности штамма дрожжей при делении клеток. **ΔEST3** –

нокаут гена белка *hpEst3*, **WT** – штамм дикого типа, **ΔTERT** – штамм с удалённым геном каталитической субъединицы теломеразы. Четыре точки в одном пересеве соответствуют последовательным разведениям одной культуры. **Б** – анализ длины теломер в штамме с удалённым геном-кандидатом *Est3* и в штамме дикого типа методом анализа рестрикционных фрагментов концов хромосом с помощью Саузерн блот анализа.

Мы характеризовали жизнеспособность полученных штаммов методом высевания аликвот клеточной культуры с последующими разбавлениями на твердую среду на каждой стадии пересева клеток (Рисунок 1, 2). Отсутствие активности теломеразы, связанное с отсутствием необходимого белкового компонента *Est1* или *Est3*, приводило к укорочению теломер с каждым делением клетки, поэтому такая клеточная культура производила меньше колоний по сравнению с клетками дикого типа с гибелью большинства клеток через ~50-100 поколений (сенесценс-фенотип). Мы наблюдали сниженную жизнеспособность клеток в штаммах-нокаутах уже на первой стадии эксперимента (Рисунок 1, 2, 1-й пересев). В соответствии с литературными данными, восстановление жизнеспособности клеточной культуры по истечении времени связано с иницированием альтернативных механизмов удлинения теломер, скорее всего, рекомбинации.

Длина теломер в полученных штаммах-нокаутах по генам *Est1* или *Est3* и штамме дикого типа была проверена методом анализа рестрикционных фрагментов

концов хромосом с помощью Саузерн-блот анализа (Рисунок 1, 2). Для детекции теломер мы использовали радиоактивно меченный олигонуклеотид, комплементарный к теломерной последовательности дрожжей *H. polymorpha*. В дорожках 3, 4 рисунков 1Б и 2Б можно наблюдать смещение сигнала в область, соответствующую более коротким продуктам, что указывает на укорочение теломер при делении клеток в нокаутном штамме.

Анализ аминокислотной последовательности белка hpEst1 в дрожжах *H. polymorpha* позволяет заключить, что белок содержит все характерные для белка Est1 домены, Est1-домен, TPR и DBD. Анализ аминокислотной последовательности белка hpEst3 содержит характерный TPP1 домен. Данные по жизнеспособности клеток и анализ длины теломер позволяют утверждать, что полученные нокаутные по белкам hpEst1 или hpEst3 штаммы характеризуется фенотипом укорачивающихся теломер, а наличие гомологии белков-кандидатов с Est1 и Est3 семействами соответственно не оставляет сомнения в идентификации белков Est1 и Est3 в термотолерантных дрожжах *H. polymorpha*.

2. Разработка метода выделения белков hpEst1 и hpEst3, пригодных для структурных и функциональных исследований

Гены белков hpEst1 и hpEst3 были клонированы под индуцируемый T7 промотор в экспрессионный вектор pET30aTEV (получены конструкции pET30aTEV_hpEst1 и pET30aTEV_hpEst3) для последующего выделения рекомбинантных белков Est1 и Est3 из *E. coli*. Этот вектор содержит последовательность, кодирующую 6 гистидинов и S- таг с N- конца белка, а также сайт узнавания TEV-протеазы для возможности удаления аффинного тага. Белок hpEst1 не удалось получить в растворимой фракции, это может быть обусловлено тем, что этот белок обладает достаточно большой молекулярной массой, возможно, не структурирован, так как в клетках дрожжей могут быть недостающие в *E. coli* условия и компоненты, необходимые для правильного сворачивания белка.

Выход чистого белка hpEst3 с литра культуры клеток *E. coli* составил 31,4 мг, чистота полученного препарата составила $\approx 99,8\%$. Полученный белковый препарат был охарактеризован методами динамического светорассеяния (DLS), термофлюориметрии (TF) и кругового дихроизма (CD). Степень гомогенности полученного препарата белка hpEst3 по результатам DLS составила 100%, %полидисперсности составил 11%, менее 15% - монодисперсный образец. %массы – процент частиц данного размера по массе - 100%, что означает наличие популяции частиц одного размера, %интенсивности – процент частиц данного размера по

интенсивности - 100%, что также означает наличие популяции частиц одного размера. По результатам спектров КД, полученный белковый препарат являлся структурированным, состоящим из смеси α -спиралей и β -листов. Полученный препарат белка полностью удовлетворял всем требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований.

3. Структурные исследования белка hpEst3

Для определения структуры белка hpEst3 был выбран метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Для решения структуры этим методом были получены образцы белка, содержащего метки ^{15}N и $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$. Выход чистого препарата белка ^{15}N -hpEst3 составил 15,3 мг с литра культуры клеток *E.coli*, чистота полученного препарата составила $\approx 99,8\%$. Выход чистого препарата белка $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -hpEst3 составил 5 мг с литра культуры клеток *E.coli*, чистота полученного препарата составила $\approx 99,8\%$. Работа выполнена совместно с Лабораторией магнитной томографии и спектроскопии, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (Польшаков В.И.).

В полученной структуре hpEst3 можно увидеть характерный структурный мотив – OB-fold (Рисунок 3, желтый) (укладка OB-fold – Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding Fold). OB-fold был идентифицирован в белках бактерий и дрожжей как домен, связывающий олигонуклеотиды и олигосахариды. Впоследствии было показано, что различные OB-fold могут участвовать во взаимодействии с ДНК, РНК и белками.

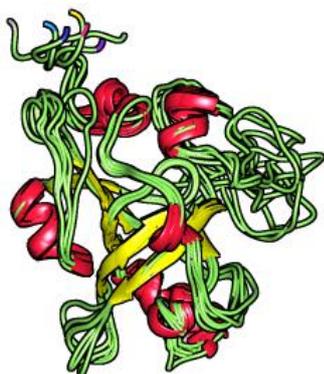


Рисунок 3. Семейство 7 структур hpEst3. Красным выделены α -спирали, желтым β -листы, зеленым петли.

Полученная структура hpEst3 обладает высокой степенью структурной гомологии с ранее полученной структурой Est3 *S.cerevisiae* (scEst3), а OB-fold полученной структуры hpEst3, как и OB-fold scEst3, обладает высокой степенью структурной гомологии с OB-fold TPP1 человека (Рисунок 4). Спираль $\alpha 5$ hpEst3 отсутствует в scEst3, однако хорошо накладывается в hTPP1. Интересным элементом является петля L12, в scEst3 её длина составляет 7 аминокислотных остатка, в hpEst3 10 аминокислотных остатков, а в hTPP1 21 аминокислотный остаток (121-141). Спираль $\alpha 2$ в hpEst3 и $\alpha 5$ в scEst3, также, как и в hTPP1, кэпирует β -бочку и располагается к её вертикальной оси под углом $\sim 40^\circ$. Также следует обратить внимание на высоко консервативную спираль $\alpha 3$ в hpEst3 и $\alpha 6$ в scEst3. Этот структурный элемент отсутствует в hTPP1, из чего можно сделать

предположение, что эта спираль характерна именно для дрожжей и несет некую специфическую для этих организмов функцию. Спираль $\alpha 4$ в hpEst3 отсутствует как в scEst3, так и в hTPP1.

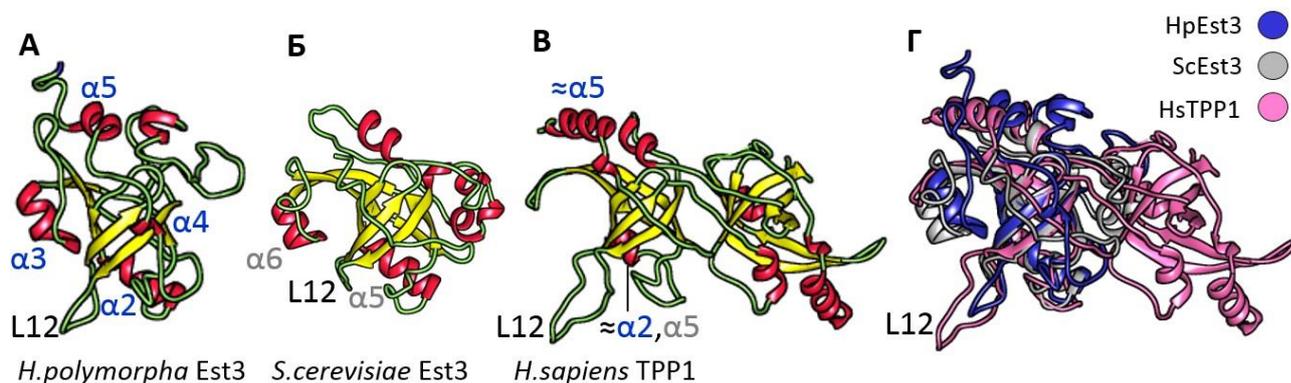


Рисунок 4. А. Структура белка hpEst3. Окрашены элементы вторичной структуры: α -спирали (красный), β -листы (желтый) и петли (зелёный). Некоторые элементы вторичной структуры подписаны синим. Б. Структура белка scEst3 (PDB Code ID 2M9V). Окрашены элементы вторичной структуры: α -спирали (красный), β -листы (желтый) и петли (зелёный). Некоторые элементы вторичной структуры подписаны серым. В. Структура белка hTPP1 (PDB Code ID 2I46). Окрашены элементы вторичной структуры: α -спирали (красный), β -листы (желтый) и петли (зелёный). Г. Наложение структур hpEst3 (синий) и scEst3 (серый) и hTPP1 (розовый).

Таким образом, полученная структура hpEst3 дала новую информацию об особенностях структуры этого белка в дрожжах, позволила выявить элементы, консервативные именно для дрожжей, а также элементы, консервативные для всех видов, включая человека.

4. Поиск границ доменов каталитической субъединицы дрожжей *H. polymorpha* (hpTERT)

Ранее в нашей лаборатории была идентифицирована и получена экспрессией в *E. coli* рекомбинантная полноразмерная теломеразная обратная транскриптаза дрожжей *H. polymorpha* (hpTERT). Однако белок оказался недостаточно стабильным в растворе: агрегировал при комнатной температуре уже при низкой концентрации (2 мг/мл). Такой белок не удовлетворял требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований. Однако домены TERT, полученные отдельно, могли быть структурированы и стабильны в растворе. Поэтому следующей задачей данной работы было получение доменов TERT *H. polymorpha* для структурных исследований, которые бы удовлетворяли следующим требованиям: возможность экспрессии и очистки в достаточном количестве (выход белкового препарата не менее 5 мг с литра культуры клеток), растворимость в стандартных буферах, устойчивость к агрегации

при комнатной температуре, структурированность, возможность концентрирования до 5-10 мг/мл.

Биоинформатический анализ последовательности hpTERT

На первом этапе работы были определены участки, соответствующие функциональным доменам TERT *H.polymorpha*. В состав TERT входят: TEN - N-концевой домен, линкер и кольцевая структура (TERT ring), включающая в себя TRBD – РНК-связывающий домен, RT – каталитический (обратнотранскриптазный) домен и СТЕ – С-концевой домен. Был проведён сравнительный анализ последовательностей hpTERT только с теми TERT, для доменов которых известна кристаллическая структура (*T.castaneum*, *T.thermophila*, *Oryzias latipes*, *Takifugu rubripes*). Для уточнения границ структурных доменов в hpTERT, в области каждого из них далее генерировали около десяти вариантов последовательности, отличающихся на несколько аминокислотных остатков с N- и С-конца каждого домена. Поскольку известно, что N-концевой домен отделён от остальной части TERT неструктурированным линкером, также было принято решение создать конструкции на основе TERT ring с удалённым TEN доменом. Для этого были сгенерированы несколько вариантов последовательности hpTERT, укороченные с N-конца: N-1(154-783), N-2(155-783) и так далее.

Для нескольких сотен сгенерированных вариантов последовательностей доменов hpTERT проводили биоинформатический анализ с помощью серверов XtalPred, ProtParamTool и PPCpred для поиска таких фрагментов, которые имели бы наибольшую вероятность экспрессии в *E.coli*, растворимости, успешной очистки и кристаллизуемости. В результате были выбраны 14 доменов, имеющие наилучшие параметры, для дальнейшей экспериментальной проверки.

Разработка метода выделения доменов hpTERT, пригодных для структурных исследований

Из 14 отобранных вариантов укороченной последовательности hpTERT, один вариант соответствовал каталитическому домену (RT); три варианта РНК-связывающему домену; два варианта С-коцевому домену; четыре варианта TEN домену, укороченному с N- и/или с С-конца; и еще пять последовательностей, соответствовали полноразмерному белку без N-домена и с укорочением с N-конца на 2, 6, 24 и 25 аминокислотных остатков соответственно (N-, N-2, N-6, N-24, N-25). Выбранные фрагменты были клонированы под индуцируемый T7 промотор в экспрессионный вектор pET30aTEV, в котором последовательность белка слита с последовательностью, кодирующей 6 гистидинов (6His) и S- таг с N- конца белка, а

также сайт узнавания TEV-протеазы для возможности удаления аффинного тага. Экспрессия белков в *E.coli* индуцировалась ИПТГ, очистка проводилась с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA сефарозе в нативных условиях.

В результате, в растворимой форме из 14 белков удалось получить 3 фрагмента: N-концевой домен (далее hrTEN) (аминокислотные остатки 1-153 hrTERT, предсказанная молярная масса 18,6кДа), N-2 (далее hrN-2) (аминокислотные остатки 155-783 hrTERT, предсказанная молярная масса 78кДа) и N-25 (далее hrN-25) (аминокислотные остатки 178-783 hrTERT, предсказанная молярная масса 75кДа). Результаты экспрессии и очистки белков представлены на рисунке 5.

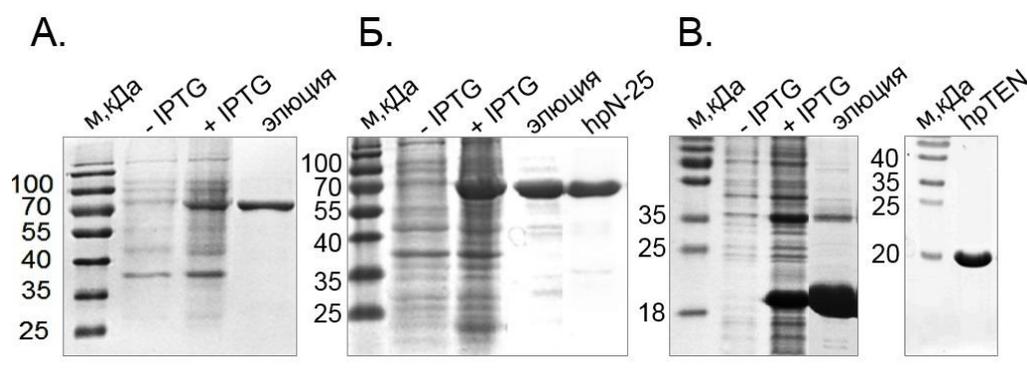


Рисунок 5.

Результаты экспрессии, выделения и очистки рекомбинантных фрагментов

hrTERT. Анализ проводили методом электрофореза в 10% (А, Б) и 15% (В) ПААГ в денатурирующих условиях. В дорожках «-IPTG» и «+IPTG» проанализированы белки тотальных клеточных лизатов *E.coli* до и после индукции экспрессии ИПТГ. Образец в дорожке «элюция» соответствует фракции белка, очищенного с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA сефарозе. Результаты экспрессии и очистки А. hrN-2 (78кДа). Б. hrN-25 (75кДа). Образец в дорожке «hrN-25» соответствует фракции белка после дополнительной очистки на ионообменной смоле гепарин-сефарозе и с помощью гель-фильтрации на хроматографической колонке Superdex 200. В. hrTEN (18,6кДа). Образец в дорожке «hrTEN» соответствует фракции белка после дополнительной очистки с помощью гель-фильтрации на хроматографической колонке Superdex 75.

Конечные характеристики полученных белковых препаратов:

- hrN-2 – выход составил 2 мг белкового препарата с литра культуры клеток, степень чистоты полученного препарата составляла 98-99%, по результатам DLS препарат содержал две популяции частиц, что давало два пика на графике. Процент полидисперсности первого пика, расчетная молекулярная масса которого совпадала с расчетной молекулярной массой белка hrN-2, составил 31,6%, что говорит о полидисперсности полученного образца (менее 15% - монодисперсный образец). %массы – процент частиц данного размера по массе – составил 98% (100%

означает наличие популяции частиц одного размера), оставшиеся 2% составляли компоненты расчётной массы, значительно превышающей теоретически рассчитанную для данного белка. Таким образом, полученный белковый препарат не удовлетворял требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований.

- hrN-25 – выход составил 8 мг чистого белкового препарата с литра культуры клеток, степень чистоты полученного препарата составляла 99%, по результатам DLS препарат содержал две популяции частиц, что давало два пика на графике. Процент полидисперсности первого пика, расчетная молекулярная масса которого совпадала с расчетной молекулярной массой белка hrN-25, составил 14,1%, что говорит о монодисперсности полученного образца. %массы составил 99,8%, 0,2% составляли компоненты расчётной массы, значительно превышающей теоретически рассчитанную для данного белка. Таким образом, в образце присутствовали высокомолекулярные примеси, предположительно белковые агрегаты, однако их количество можно было считать незначительным. По результатам спектров КД, полученный белковый препарат являлся структурированным, с преобладанием α -спиральных элементов вторичной структуры. Выход и чистота полученного препарата удовлетворяли требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований, однако полученный белок проявлял склонность к агрегации со временем и нестабильность в растворе при комнатной температуре, таким образом, требуется дальнейший поиск стабилизации полученного белка в растворе.

- TEN – выход составил 34 мг чистого белкового препарата с литра культуры клеток, степень чистоты полученного препарата составляла 99,6%, по результатам DLS препарат содержал частицы одного размера. Процент полидисперсности составил 13,8%, что говорит о монодисперсности полученного образца. %массы составил 100%. По результатам спектров КД, полученный белковый препарат являлся структурированным, с преобладанием α -спиральных элементов вторичной структуры. Таким образом, полученный препарат белка полностью удовлетворял всем требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований.

5. Структурные исследования N-концевого домена hrTERT (hrTEN)

Структурные исследования hrTEN методом кристаллографии

Для кристаллизации hrTEN были получены как нативные, так и селенометионин замещенные образцы белка. Кристаллизация проводилась в условиях ограниченного протеолиза трипсином, были получены кристаллы, пригодные для

определения структуры методом кристаллографии. Данная работа выполнена совместно с Гамбургским подразделением Европейской Лабораторией Молекулярной Биологии (European Molecular Biology Laboratory, EMBL), группа Ламзина В. Структура белка была решена с использованием селенометионин замещенного образца с использованием метода многоволновой аномальной дифракции (Multiple-wavelength Anomalous Diffraction (MAD)) с разрешением 2.4Å. Полученная модель состоит из трёх фрагментов: Met1-His29, Arg33-Thr82 и Arg97-Asn142 (Рисунок 6).

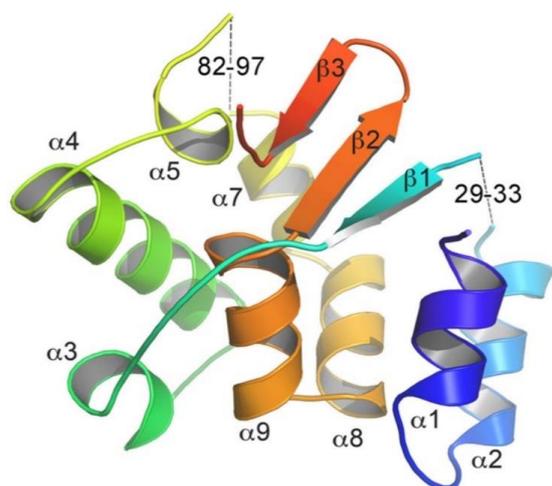


Рисунок 6. Кристаллическая структура hrTEN. Последовательность белка окрашена по радуге от С-конца (красный) к N-концу (синий). Недостающие фрагменты указаны цифрами. PDB Code ID 5NPT.

Структурные исследования hrTEN методом спектроскопии ЯМР

Для определения структуры белка hrTEN в растворе использовался метод спектроскопии ЯМР. Были получены образцы белка, содержащего радиоактивные метки ^{15}N и $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$. Работа выполнена совместно с Лабораторией магнитной томографии и спектроскопии, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (лаборатория Польшакова В.И.). Для полученного семейства ЯМР структур hrTEN наблюдается хорошо структурированный $\alpha\beta$ -кор (аминокислотные остатки 1–70, 100–138), подвижная центральная петля (аминокислотные остатки 71–99) и неструктурированный С-конец (аминокислотные остатки 139–159) (Рисунок 7).

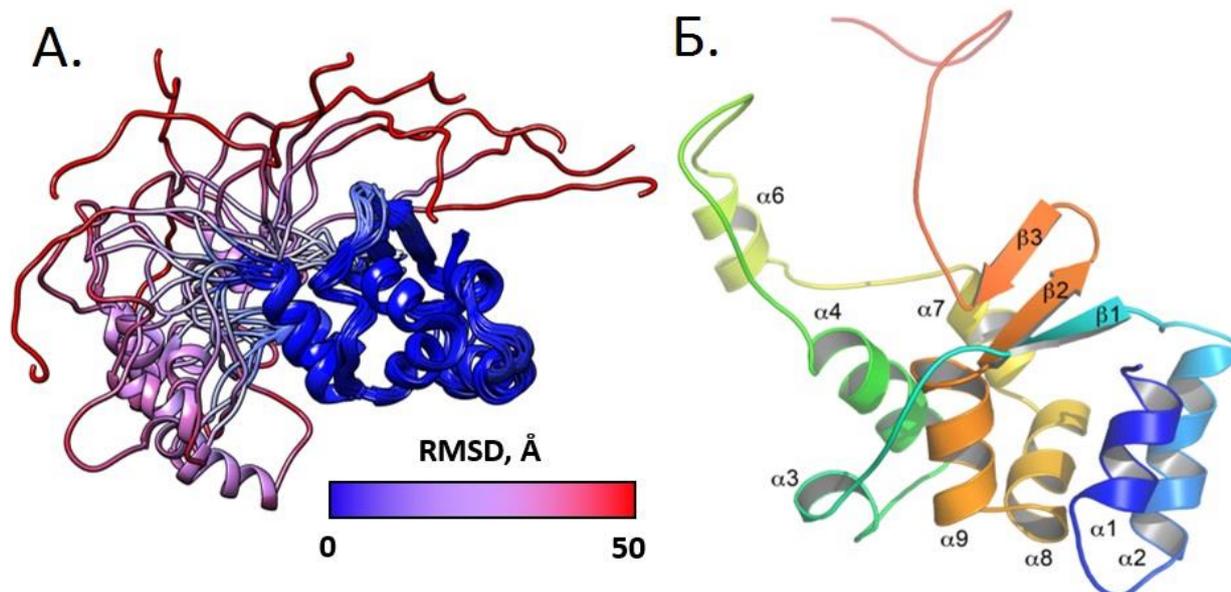
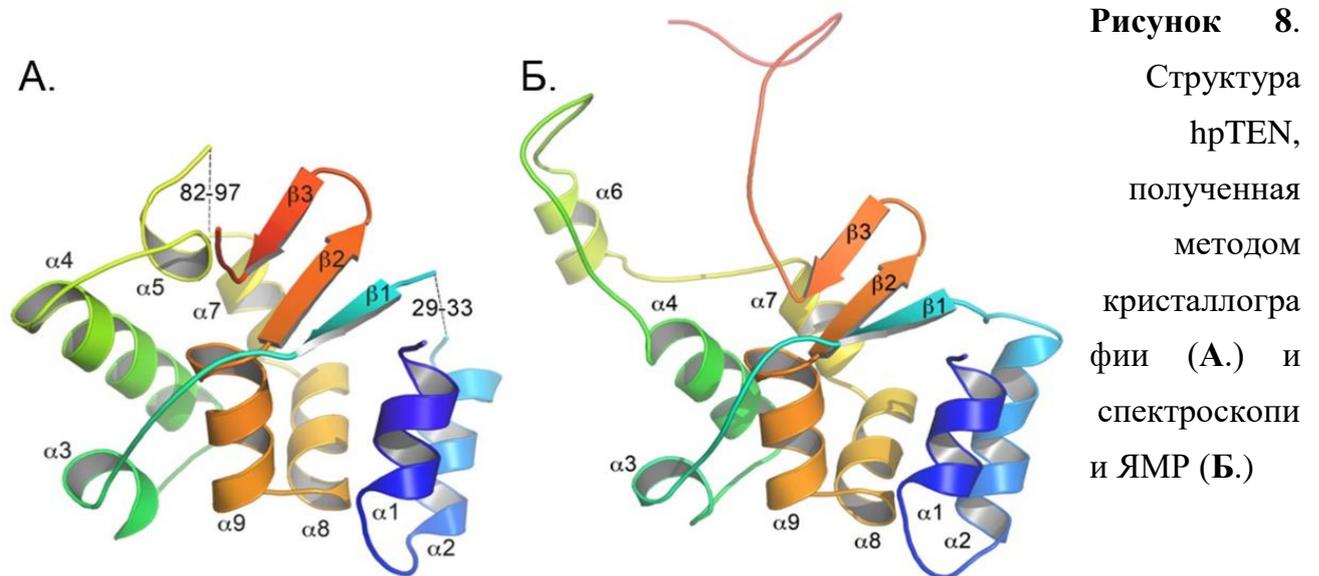


Рисунок 7. А. Семейство из 10 моделей hrTEN. Структуры окрашены по RMSD (Root-mean-square deviation) (упорядоченные участки – синий, неупорядоченные, подвижные участки - красный). **Б.** Репрезентативная модель hrTEN. PDB Code ID 5LGF

Сравнение структур hrTEN, полученных методом ЯМР спектроскопии и кристаллографии

Коровая часть белка, состоящая из 6 α -спиралей (α_1 , α_2 , α_4 , α_7 , α_8 и α_9) и 3 β -листов, одинаково организована в обеих структурах (Рисунок 8). RMSD между атомами остатков основной цепи в коровой части белка составляет 0.80 Å. Основные отличия между кристаллической и ЯМР структурами расположены в подвижных частях белка (спираль α_6 и С-концевые аминокислотные остатки 143–159).



Сравнение структур hrTEN и TEN T. thermophila

Ранее была решена структура N-концевого домена реснитчатых *T. thermophila* (ttTEN, PDB code ID 2B2A), обладающая уникальным фолдом, названным TERT essential N-terminal (TEN) домен. Несмотря на невысокую степень гомологии в аминокислотной последовательности, структуры hrTEN и ttTEN обладают схожим структурным кором, состоящим из α/β структур с центральным α -спиральным мотивом, включающим спирали α_7 , α_8 и α_9 (Рисунок 9).

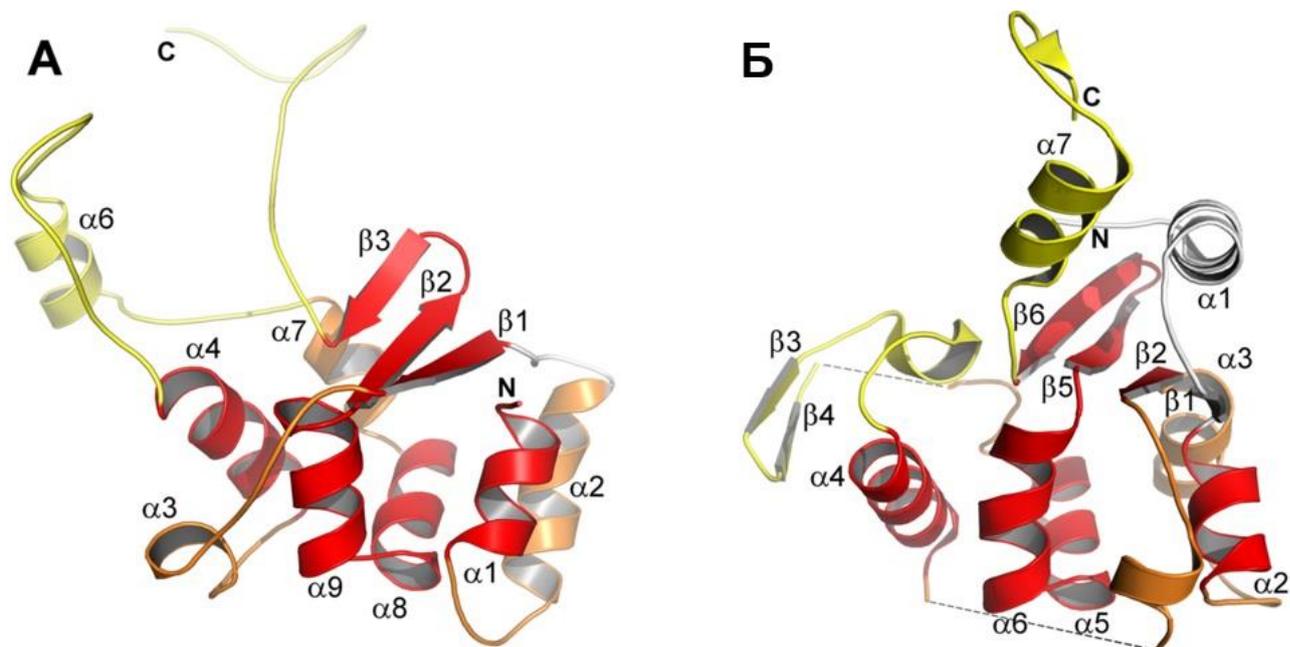


Рисунок 9. Сравнение структур hrTEN и ttTEN. **А.** Структура hrTEN (красным окрашены хорошо совпадающие элементы hrTEN и ttTEN ($\alpha 7$ – $\alpha 8$ –Gly– $\alpha 9$); желтым окрашены похожие, белым сильно отличающиеся или отсутствующие в одной из структур. **Б.** Кристаллическая структура ttTEN (PDB code ID 2B2A) окрашена аналогичным образом.

В обеих структурах спирали $\alpha 8$ и $\alpha 9$ расположены под острым углом (V-мотив) благодаря высоко консервативному Gly117, обеспечивающему острый поворот цепи (Рисунок 9). V-мотив практически идентичен для ttTEN и hrTEN (аминокислотные остатки 107–127 в hrTEN и 133–155 в ttTEN). Последовательность V-мотива содержит консервативный участок hxxhxxxhGxxxhxxhh, где h – большой гидрофобный аминокислотный остаток, G - высоко консервативный Gly, x – любой аминокислотный остаток (Рисунок 10).

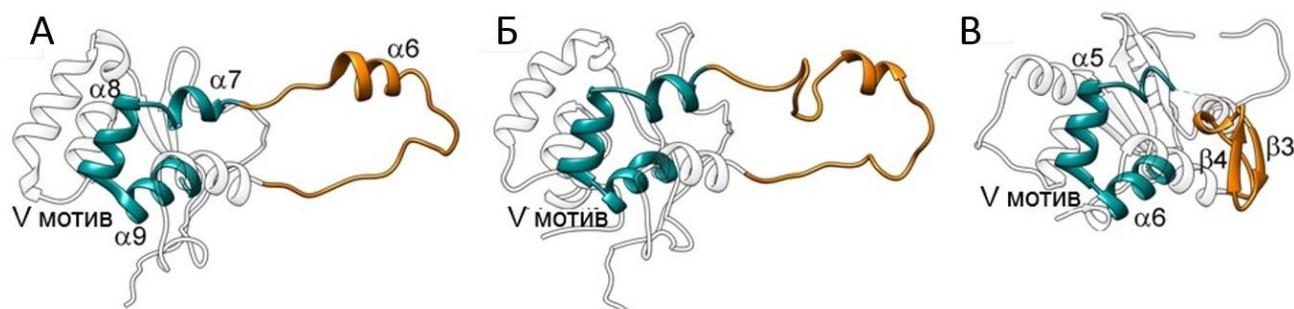


Рисунок 10. Структуры hrTEN (**А**), предсказанной структуры hTEN (**Б**) и структура ttTEN (**В**). Элементы структурного кора, соответствующие $\alpha 7$ – $\alpha 8$ –Gly– $\alpha 9$ в hrTEN окрашены сине-зелёным, участки, соответствующие центральной петле 71–99 в hrTEN окрашена оранжевым.

Этот консервативный участок принадлежит к так называемому T2-мотиву

(наиболее консервативный участок TEN домена). Он состоит из двух участков, V-мотива и второго консервативного участка из 5 аминокислотных остатков, отделённых друг от друга последовательностью из 15-25 аминокислотных остатков. V-мотив расположен между спиралями α_4 с длинной петлёй с одной стороны и двумя спиралями (α_1 и α_2) с β -листом из трёх антипараллельных β -тяжей (β_1 , β_2 , β_3) с другой стороны (Рисунок 10 Б-Г).

Таким образом, было показано, TEN домен TERT эволюционно разных организмов, таких как реснитчатые (ttTEN) и дрожжи (hpTEN), обладают схожей структурой. Несмотря на низкую гомологию в аминокислотной последовательности, структурный кор hpTEN консервативен, причём наибольшая консервативность наблюдается в V-мотиве. Сходство в последовательности в этой области в большом количестве различных организмов указывает на структурную и функциональную консервативность TEN домена.

Взаимодействие hpTEN с нуклеиновыми кислотами

На данный момент существует несколько гипотез функционирования TEN домена. Согласно одной из них, TEN домен служит якорным сайтом для ДНК при синтезе теломерного повтора. Данные, полученные кросс-сшивками, позволяют предположить, что якорный сайт расположен либо в TEN домене, либо в линкере между TEN и TRBD доменами. Было идентифицировано несколько аминокислотных остатков, вовлеченных в связывание ДНК в структуре ttTEN. Однако эта гипотеза не подтверждается экспериментальными данными, поскольку TEN проявляет только очень слабую и зачастую вовсе не детектируемую аффинность в одноцепочечным ДНК фрагментам. При этом TERT ring без TEN домена взаимодействует с одноцепочечной ДНК, хотя TEN домен улучшает это связывание. Была предложена альтернативная модель, согласно которой TEN домен стабилизирует гетеродуплекс, образованный теломерным ДНК продуктом и матричной РНК в активном сайте. В данной работе для проверки существующих гипотез было проверено *in vitro* связывание hpTEN с РНК и ДНК фрагментами, моделирующими фрагменты теломеразной РНК и теломерной ДНК. В качестве метода было выбрано гетероядерное ЯМР титрование. Для этого hpTEN, в котором все азоты были замещены на ^{15}N , титровали возрастающей концентрацией РНК и ДНК фрагментами до 5-10 кратного молярного избытка над белком. При этом взаимодействие ^{15}N -hpTEN с нуклеиновыми кислотами детектировали по изменениям положения ^1H и ^{15}N химических сдвигов аминокислотных остатков, расположенных в области связывания.

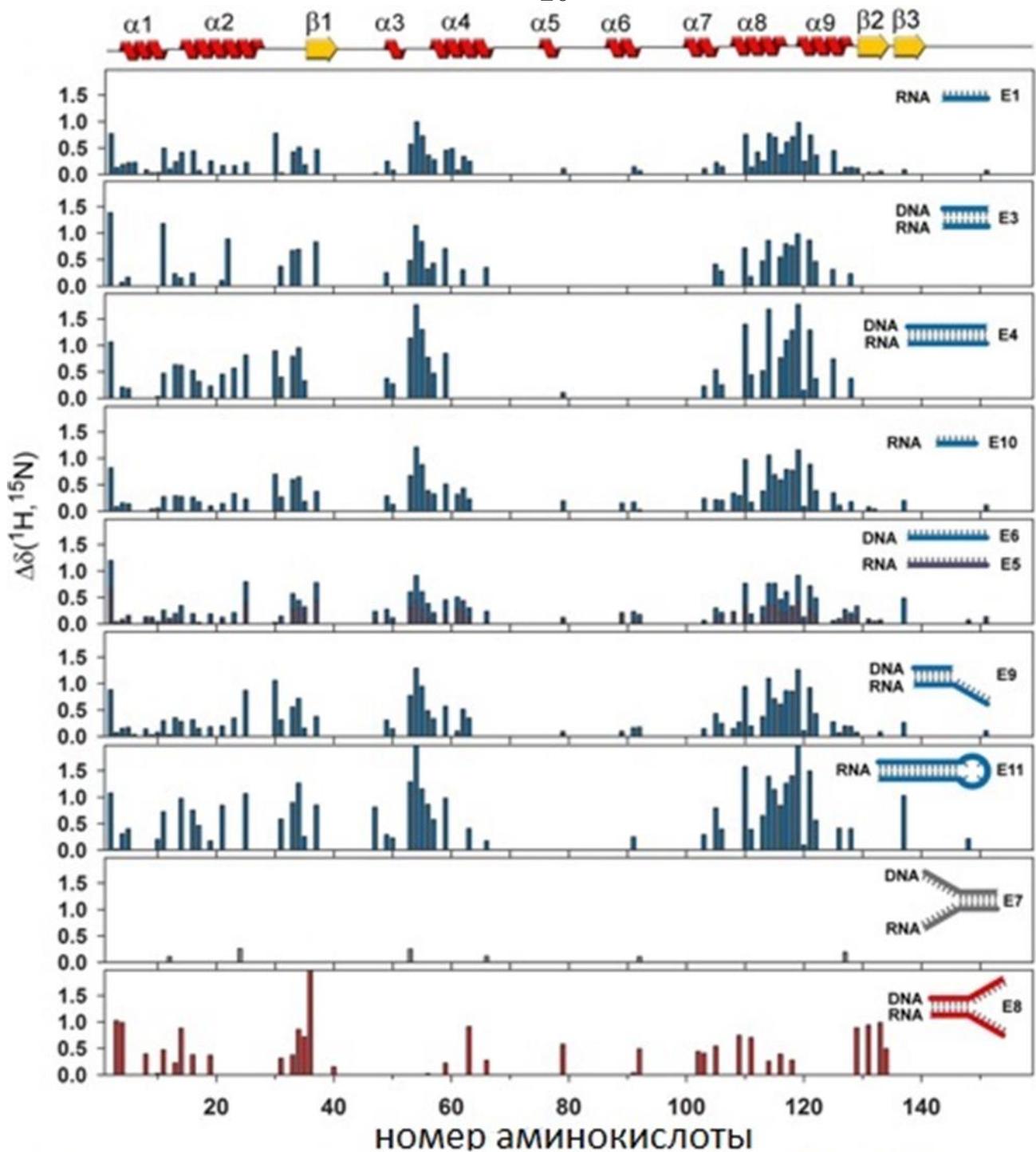


Рисунок 11. Взаимодействие hrTEN с РНК и ДНК олигонуклеотидами. Гистограмма, отражающая степень изменения химических сдвигов ^1H и ^{15}N в аминокислотной последовательности hrTEN домена при ЯМР титровании олигонуклеотидами, моделирующими фрагменты теломеразной РНК, теломерной ДНК или РНК-ДНК гетеродуплекса.

Одноцепочечная РНК, моделирующая фрагмент TER, а также некоторые другие варианты матричной РНК или ДНК-РНК гетеродуплекс сильно влияют на сигналы некоторых аминокислотных остатков hrTEN в спектрах ЯМР, что говорит о специфическом взаимодействии между этими нуклеиновыми кислотами и белком

(Рисунок 11).

Аминокислотные остатки, вовлеченные во взаимодействие с нуклеиновыми кислотами, расположены в структуре hrTEN в двух кластерах (Рисунок 12). Первая поверхность, кластер I (Рисунок 12, А), включает в себя аминокислотные остатки, расположенные в спиральных $\alpha 8$ и $\alpha 9$ структурного кора (His113–Glu119), которые, с участием аминокислотных остатков из спирали $\alpha 4$ и петли Asn53–His56, образуют бороздку на поверхности hrTEN (Рисунок 12, А). Второй участок связывания, кластер II, взаимодействует с нуклеиновыми кислотами с большей аффинностью, чем кластер I. Кластер II состоит из аминокислотных остатков, расположенных в спиральных $\alpha 1$, $\alpha 3$ и в β -листе (R2–K11, G30–R39, G79, Ser129–Tyr136) (Рисунок 12, Б).

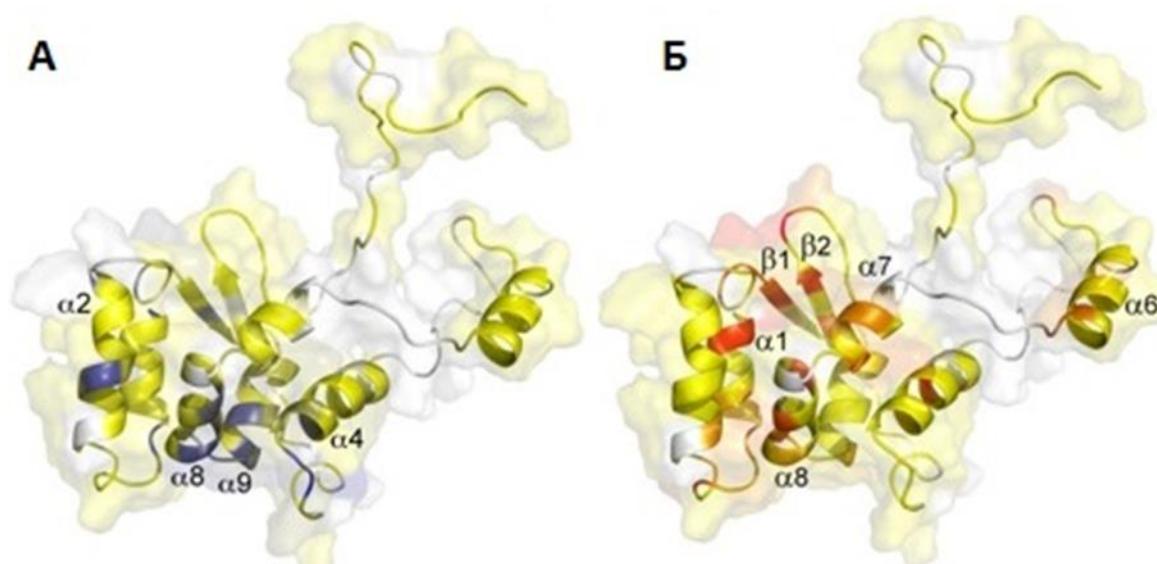


Рисунок 12. Структура hrTEN домена, окрашена по величине изменения химических сдвигов при титровании гетеродуплексом (А, кластер I) и нативной РНК-ДНК «вилкой» (Б, кластер II). Желтый – нет взаимодействия, синий или красный – наибольшие изменения при титровании гетеродуплексом и «вилкой» соответственно. Аминокислотные остатки, отсутствующие в ^1H – ^{15}N HSQC спектре, окрашены белым.

Кластер II специфически узнаёт структуру «вилку», представляющую собой разветвление комплементарного ДНК-РНК гетеродуплекса на одноцепочечную ДНК и РНК (Рисунок 11, Е8). При этом, согласно данным ЯМР титрования, большинство аминокислотных остатков из кластера II, вовлечённых во взаимодействие с вилкой, не участвуют во взаимодействии с оцРНК, оцДНК, РНК-ДНК дуплексом или с инвертированной вилкой, в которой дуплексная и одноцепочечные участки РНК и ДНК поменяны местами (Рисунок 11, Е7). Стоит отметить, что аминокислотные остатки, образующие кластер I и II примыкают либо входят в состав двух высоко консервативных между hrTEN и ttTEN структурных мотивов, и включают участки

последовательностей, консервативные среди TEN доменов разных видов.

Для уточнения локализации двух поверхностей, вовлечённых во взаимодействие с РНК и ДНК, были получены hpTEN с аминокислотными заменами. Для мутагенеза были выбраны поверхностные аминокислотные остатки, образующие кластер I (N53, S55, R110, E119) и кластер II (W36, R131, M132, N134). Однако, получить hpTEN с заменами в кластере II не удалось, данный белок не экспрессировался в *E.coli*. Возможно, это связано с тем, что выбранные аминокислотные остатки необходимы для корректного сворачивания белка. Выбранные остатки, входящие в состав кластера II, были заменены на аланин и в результате были получены белки hpTEN с двумя (N53A/S55A), тремя (N53A/S55A/R110A) и четырьмя заменами (N53A/S55A/R110A/E119A).

Отличие во взаимодействии TEN домена с вилкой от взаимодействия с дуплексом, оцДНК и РНК говорит о возможном участии TEN домена в ограничении длины гетеродуплекса, образованного при синтезе TERT теломерного ДНК повтора по РНК матрице. Понимание структурных основ этого специфического взаимодействия требует дополнительных исследований. Согласно нашим данным, TEN домен взаимодействует с РНК цепью гетеродуплекса, при этом, практически не образуя контактов с ДНК цепью. Некоторые участки теломеразной РНК могут взаимодействовать с поверхностью, соответствующей кластеру I в TEN домене.

Предположительная роль TEN домена в работе теломеразы

Согласно полученным данным, hpTEN взаимодействует с гетеродуплексом, образованным между матричным участком теломеразной РНК и новосинтезированной ДНК в месте разветвления цепей, а также с участками TER вне ДНК-РНК дуплекса. Основываясь на полученных результатах, нами была предложена модель полноразмерного комплекса hpTERT с гетеродуплексом, связанным в центральной поре (Рисунок 13). При построении модели была использована структура hpTEN – репрезентативная модель, полученная методом ЯМР спектроскопии. Основная часть модели TERT – TERT ring – и ДНК-РНК гетеродуплекс, связанный в центральной поре, смоделированы при использовании TERT *T.castaneum* (PDB Code ID 3KYL), последовательность матричной РНК и теломерной ДНК заменены на соответствующие из *H.polymorpha*. Положение hpTEN относительно TERT ring смоделировано на основании данных, полученных из ЯМР титрования.

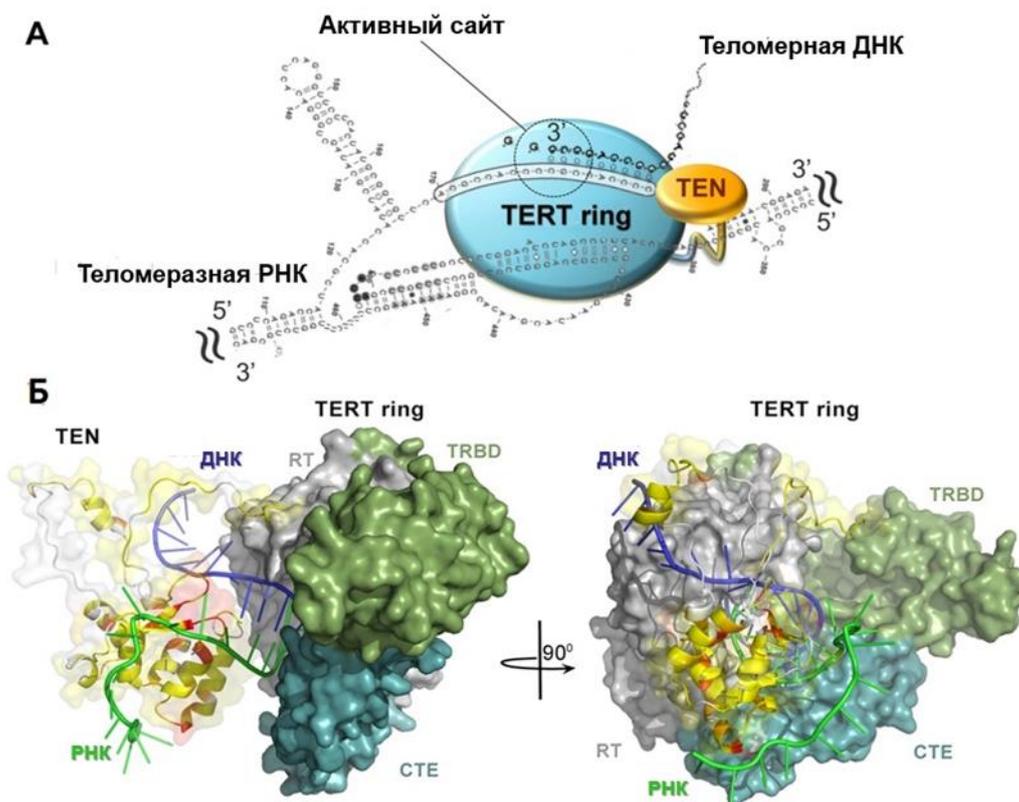


Рисунок 13. Предположительная роль TEN домена в работе теломеразы. **А.** Схема минимального теломеразного комплекса, состоящего из теломеразной обратной транскриптазы и теломеразной РНК. **Б.** Комбинированная 3Д модель hrTERT (в TERT ring окрашены TRBD, RT и CTE домены. TEN домен окрашен аналогично рисунку 12 Б, по величине изменения химических сдвигов при титровании нативной РНК-ДНК «вилкой». Теломеразная РНК окрашена зелёным, теломерная ДНК – синим.

Мы предполагаем, что TEN домен расположен в стороне (по отношению к активному сайту) от центральной поры TERT. Аналогичное положение TEN было предложено ранее в модели полноразмерного hTERT, в которой N- и C-концевые участки TEN домена были помещены в бороздку гетеродуплекса. Однако в модели, предлагаемой в данной работе, ориентация TEN домена немного отличается. Фрагменты цепи непосредственно перед $\beta 1$ и петля между $\beta 2$ и $\beta 3$ непосредственно участвуют в специфическом узнавании структуры ДНК-РНК вилки (Рисунок 8, рисунок 12, Б). В связи с этим, в созданной модели TEN домен расположен таким образом, что эти участки ориентированы в направлении центральной поры TERT ring и ДНК-РНК вилки. В таком положении N-конец TEN домена располагается достаточно близко для взаимодействия с теломеразной РНК. С-концевой участок TEN неупорядоченный как в кристаллической, так и в структуре ЯМР, однако он может быть расположен близко к теломерной ДНК для их возможного взаимодействия.

В связи с тем, что в последовательность матричного участка hrTER входит 2 повтора, длина гетеродуплекса между новосинтезированной теломерной ДНК и TER может достигать 16 нуклеотидов в длину. Однако, известно, что длина такого гетеродуплекса в теломеразах составляет 5-6 или 7-8 нуклеотидов в зависимости от организма. Ступенчатое разделение гетеродуплекса должно совпадать с транслокацией теломеразы после добавления каждого нового нуклеотида. Такой механизм не допускает слишком сильного взаимодействия, которое может помешать полному разделению цепей для RAP (Repeat-addition processivity) или процессивности 2 типа. RAP осуществляется по специальному механизму, включающему разделение цепей гетеродуплекса теломерной ДНК-TER, перемещение матричного участка TER относительно цепи ДНК, отжиг матричного участка TER на 3' конец теломерной ДНК и позиционирование гетеродуплекса в активном сайте TERT для осуществления синтеза.

Другим важным моментом является взаимодействие TEN домена с теломерной ДНК. Основываясь на предложенной модели, оцДНК до 5' конца гетеродуплекса расположена между TEN доменом и С-концевым доменом TERT (СТЕ). На поверхности СТЕ находится гидрофобный участок, образованный аминокислотными остатками Pe431, Leu434, Pe504, Leu548 и Pe553, которые могут стабилизировать неспаренные нуклеотиды в цепи ДНК. Эта гипотеза согласуется с недавно предложенной моделью взаимодействия гетеродуплекса и удержания оцДНК с помощью hTERT. С-концевая часть TEN домена и неупорядоченный линкер, содержащий много серинов, глутаминов и лизинов, может участвовать во взаимодействии с сахаро-фосфатным остовом ДНК, что согласуется с ранее опубликованными данными.

Важно отметить функциональное сходство между TERT и РНК полимеразой II. РНК полимеразы II также образует комплекс с РНК-ДНК гетеродуплексом (РНК продукт-ДНК матрица) и его длина ограничена 8-9 парами оснований. Белковые петли, расположенные на краю области связывания гетеродуплекса, участвуют в разделении цепей, во-первых, выступая стерическим барьером на пути растущего дуплекса, во-вторых, взаимодействуя с неспаренными нуклеотидами, таким образом компенсируя потерю энтропии за счет распаривания дуплекса. В бактериальных РНК полимеразе такой белковый участок не только стерически препятствует росту гетеродуплекса, но и напрямую взаимодействует с его крайними парами. TERT ring без TEN домена не содержит белковых участков вне гетеродуплекс-связывающей поры. TEN домен соединен с TERT ring длинным гибким линкером и может быть

расположен аналогично петлям в РНК-полимеразах, вовлечённых в разделение цепей гетеродуплекса. В модели hrTERT, представленной в данной работе, фрагмент цепи TEN 131-139 расположен непосредственно между ДНК и РНК цепями, аналогично разделяющему цепи элементу РНК-полимераз. Согласно представленной модели, hrTEN может ограничивать размер длины гетеродуплекса между матричным участком теломеразной РНК и ДНК при синтезе теломерного повтора. Таким образом hrTEN облегчает разделение цепей, необходимое для транслокации РНК и процессивности теломеразы при добавлении теломерных повторов.

ВЫВОДЫ

1. В дрожжах *H.polymorpha* обнаружены и экспериментально подтверждены дополнительные белковые компоненты теломеразы дрожжей Est1 и Est3.
2. Разработан метод получения рекомбинантных и $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ замещённых N-концевого домена (TEN) каталитической субъединицы и регуляторного белка Est3 теломеразы *H.polymorpha*, пригодных для структурных исследований.
3. Решена структура регуляторного белка Est3 теломеразы *H.polymorpha* в растворе методом спектроскопии ЯМР. Идентифицированный OB-fold полученной структуры hpEst3 обладает высокой степенью структурной гомологии с OB-fold scEst3, hTPP1 и onTEBPβ.
4. Решена структура TEN-домена hpTERT: в кристалле, полученная методом рентгеновской кристаллографии, и в растворе, полученная с использованием спектроскопии ЯМР.
5. Охарактеризовано взаимодействие hpTEN с нуклеиновыми кислотами, моделирующими участки теломеразной РНК, теломер и их комплекса. На основании полученных данных была предложена модель функционирования hpTERT. Согласно этой модели hpTEN может ограничивать размер длины гетеродуплекса между матричным участком TER и теломерной ДНК при синтезе повтора, что облегчает разделение цепей, необходимое для транслокации РНК и процессивности при добавлении теломерных повторов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Petrova O.A., Mantsyzov A.B., Rodina E.V., Efimov S.V., Hackenberg C., Hakanpää J., Klochkov V.V., Lebedev A.A., Chugunova A.A., Malyavko A.N., Zatsepin T.S., Mishin A.V., Zvereva M.I., Lamzin V.S., Dontsova O.A., Polshakov V.I., Structure and function of the N-terminal domain of the yeast telomerase reverse transcriptase. // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – V. 46. – № 3. – P. 1525-1540.
2. Mariasina S.S., Efimov S.V., Petrova O.A., Rodina E.V., Malyavko A.N., Zvereva M.I., Klochkov V.V., Dontsova O.A., Polshakov V.I., Chemical shift assignments and the secondary structure of the Est3 telomerase subunit in the yeast *Hansenula polymorpha*. // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2017. – V. 12. – P. 1-6.
3. Polshakov V.I., Petrova O.A., Parfenova Yu Yu, Efimov S.V., Klochkov V.V., Zvereva M.I., Dontsova O.A. NMR assignments of the N-terminal domain of *Ogataea polymorpha* telomerase reverse transcriptase. // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2016. – V. 10. – № 1. – P. 183-187.
4. Петрова О.А., Смекалова Е.М., Зверева М.Э., Ламзин В., Донцова О.А. Идентификация дополнительного теломеразного компонента дрожжей *H. polymorpha* – шаг на пути понимания работы комплекса на атомарном уровне. // *Доклады Академии наук*. – 2014. – V. 455. – № 3. – P. 1-6.
5. Зверева М.Э., Петрова О.А., Парфенова Ю.В., Смекалова Е.М., Малявко А.Н., Родина Е.В., Каллио И., Хакенберг К., Вигенс Т., Ламзин В.С., Донцова О.А. На пути к атомной структуре компонентов теломеразного комплекса с целью создания регуляторов контроля развития раковых клеток // *Вестник РФФИ*. – 2013. – V. 4. – № 80. – P. 33-37.