

ОТЗЫВ

официального оппонента

о диссертационной работе Ольги Алексеевны Петровой

«Структурные исследования компонентов теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha*»,
представленную на соискание ученой степени
кандидата химических наук по специальностям
02.00.10 – биоорганическая химия, 03.01.03 – молекулярная биология.

Актуальность диссертационной работы Ольги Алексеевны Петровой определяется объектами исследования – компонентами теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha*. Теломераза участвует в пролиферации стволовых, половых и зародышевых клеток и в пролиферации во всех практически типах злокачественных образований. Последнее предполагает ее использование как мишени в противоопухолевой терапии. Исследование структуры и механизма действия теломеразного комплекса актуально как для фундаментальной физико-химической биологии, так и для медицины.

Работа написана по традиционному плану. В главе «Обзор литературы» рассмотрены имеющиеся данные о структуре и функции теломеразы. Хотя теломераза является сравнительно новым объектом (ферментативная активность теломеразы впервые показана только в 1989 году), ее важность для работы клетки обуславливает весьма большое количество исследований. В главе подробно обсуждены данные 164-х источников. Следует отметить, что разделы обзора заканчиваются выводами, что говорит о неформальном отношении к написанию этой главы. Обзор хорошо иллюстрирован и его, несомненно, нужно опубликовать.

Не смотря на актуальность понимания взаимоотношения структура – функция теломеразы, структурные данные для нее весьма ограничены. Как в случае теломеразы человека, так и теломеразы из других эукариотических источников, это в основном объясняется низкой стабильностью теломеразного комплекса и трудностями получения высокой экспрессии генов компонентов комплекса. Единственная структура полноразмерного теломеразного комплекса реснитчатых определена в 2015 году методом криоэлектронной микроскопии с разрешением 9 А. В работе для получения структурных и функциональных данных для теломеразного комплекса было решено определить пространственные структуры отдельных доменов обратной транскриптазы и компонентов теломеразного комплекса *H. polymorpha*. Выбор объектов был продуманным решением и позволил, как это следует из результатов диссертационной работы, получить приоритетные результаты.

Как компоненты теломеразного комплекса были выбраны белки Est1 и Est3, необходимые для сборки, локализации и активности теломеразы *in vivo*. Идентификация

генов, кодирующих эти белки, проводились при сравнительном анализе генома *H. polymorpha* и с геномом *Saccharomyces cerevisiae*. Анализ аминокислотной последовательности полученного белка-кандидата Est1 показал, что он обладает доменным составом, характерным для Est1 белков и содержит характерные элементы - Est1 домен, ДНК/РНК связывающий домен и тетраатрикопептидные повторы. Гомология аминокислотной последовательности этого белка, его доменное строение оказалась близки к таковым, известным для ряда дрожжей. Длина открытой рамки считывания белка-кандидата составила 764 аминокислотных остатка, предсказанная масса – 88.2кДа. Длина открытой рамки считывания белка-кандидата Est3 составила 175 аминокислотных остатков, предсказанная масса – 20.27 кДа и в его составе присутствовал характерный для Est3 белков домен TPP1.

Для подтверждения соответствия этих белков компонентам теломеразного комплекса была проведена тщательная работа, включавшая получение штаммов *H. polymorpha*, нокаутных по двум генам, исследование жизнеспособности этих штаммов и анализ длины концов хромосом для штамма дикого типа и двух штаммов с нокаутом генов, кодирующих белки Est1 и Est3. Все данные подтвердили правильность идентификации этих белков в геноме *H. polymorpha*. Далее гены, кодирующих два белка, были клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli*. Выделение и очистка оказались успешны в случае белка Est3, выход которого с одного литра культуры был весьма высок – 31.4 мг/л. Белок Est1 не удалось получить в растворимой фракции клеточного экстракта, причины этого, вероятно, довольно большая молекулярная масса белка и отсутствие посттрансляционной модификации. Основной задачей было установление пространственной структуры Est3, поэтому было проведено исследование вторичной структуры белка, дисперсности и размера частиц препарата методами кругового дихроизма и динамического светорассеяния. Препарат Est3 соответствовал требованиям, предъявляемым к препаратам белков для структурных исследований. Пространственная структура Est3 была решена методом ЯМР. Важным этапом работы было получение необходимых количеств изотопно меченных (¹⁵N- и ¹⁵N, ¹³C-меченных) препаратов Est3. Решение этой структуры и ее сравнение с известными пространственными структурами белка TPP1 человека и белка Est3 *Saccharomyces cerevisiae* дали информацию об элементах, консервативных для дрожжей и об элементах, консервативных для всех видов, включая человека.

Нестабильность, склонность к агрегации полноразмерной теломеразы *H. polymorpha* и очевидная сложность получения приемлемой экспрессии всех генов комплекса делает очень сложной задачей установление пространственной структуры комплекса в целом. Поэтому, как упоминалось выше, одной из основных целей работы О.А. Петровой было получение доменов обратной транскриптазы *H. polymorpha* для структурных

исследований. Участки, соответствующие функциональным доменам фермента *H. polymorpha* – N-концевому домену - TEN, линкер и кольцевая структура (TERT ring), включающая в себя TRBD – РНК-связывающий домен, RT – каталитический домен и СТЕ – С-концевой домен были идентифицированы биоинформатическим анализом, включавшим как анализ последовательностей фермента из 4-х источников с известной пространственной структурой так и анализ нескольких сотен созданных вариантов аминокислотных последовательностей обратной транскриптазы *H. polymorpha*. Варианты были проверены биоинформатическим анализом на вероятность экспрессии в *E. coli*, растворимость, возможность успешной очистки и кристаллизуемости. Для дальнейшей экспериментальной проверки были выбраны 14 доменов, имеющие наилучшие параметры. Выбранные фрагменты были клонированы и проведена их очистка с помощью металл-хелатной хроматографии. В растворимой фракции клеточного лизата присутствовали три фрагмента. По результатам исследования их дисперсности, структурированности и стабильности для дальнейшей работы оказался пригодным N-концевой домен, состоявший из остатков 1-153 с предсказанной молекулярной массой 18.6 кДа.

Очень интересным и достаточно нетривиальным является то, что пространственная структура N-концевого домена была решена двумя методами. В рентгеноструктурном анализе использовали кристаллы белка дикого типа и белка с заменой остатков метионина на селен. Методом ЯМР была решена структура белка в растворе с использованием ^{15}N - и ^{15}N , ^{13}C -меченного TEN-домена. Сравнение структур, полученных двумя методами, показало их одинаковую в целом организацию и позволило «видеть» отсутствующий в структуре, решенной методом кристаллографии, подвижный С-концевой участок (остатки 143-159) и спирали $\alpha 5$ и $\alpha 6$, первая локализована в «рентгеновской» структуре, вторая – в структуре, решенной методом ЯМР.

О.А. Петровой проведено тщательное сравнение первичных и пространственных структур N-концевого домена обратной транскриптазы *H. polymorpha*, N-концевого домена *Tetrahymena thermophila* и аминокислотной последовательности N-концевого домена человека, эволюционно разных организмов с низкой гомологией аминокислотных последовательностей. Сравнение выявило, что три домена имеют схожую структуру, в них обнаружены высококонсервативные мотивы, V-мотив – участок 109-125 и участок 136-139. Далее полученные данные использовались для выяснения функции TEN-домена в теломеразном комплексе.

Для проверки двух гипотез функционирования TEN- домена О.А. Петрова исследовала связывание *in vitro* TEN-домена с фрагментами РНК и ДНК, моделирующими фрагменты теломеразной РНК и теломерной ДНК, методом гетероядерного ЯМР-титрования. TEN-домен, в котором атомы азота были замещены на атом ^{15}N , титровали РНК- и ДНК-фрагментами. Было установлено, что одноцепочечная РНК, моделирующая

фрагмент TER, а также другие варианты матричной РНК или ДНК-РНК гетеродуплекса сильно влияют на сигналы некоторых аминокислотных остатков домена. Специфическое взаимодействие между нуклеиновыми кислотами и белком наблюдалось в двух кластерах TEN- домена, названных «кластер I» и «кластер II». Аффинность кластера II оказалась заметно больше, чем аффинность кластера I. Кластер II специфически узнавал «вилку» разветвления комплементарного ДНК-РНК гетеродуплекса на одноцепочечную ДНК и РНК. Большинство аминокислотных остатков кластера II, вовлечённых во взаимодействие с вилкой, не участвовали во взаимодействии с одноцепочечной РНК, одноцепочечной ДНК, РНК-ДНК дуплексом и с инвертированной вилкой, в которой дуплексная и одноцепочечные участки РНК и ДНК были поменяны местами. Для выяснения мест взаимодействия аминокислот кластеров с нуклеиновыми кислотами методом сайт-направленного мутагенеза были получены несколько мутантных форм двух кластеров. При этом удовлетворительная экспрессия генов мутантных форм была получена только для форм с заменами аминокислот в кластере I на аланин. В кластере II для мутантных форм не удалось получить приемлемую экспрессию их генов.

Для определения констант диссоциации при взаимодействии белка дикого типа и мутантных форм с нуклеиновыми кислотами использовался новый метод, предложенный только в 2010 году – термофорез. Анализ полученных величин констант диссоциации позволил заключить, что TEN-домен взаимодействует с РНК цепью гетеродуплекса, но не образует контактов с ДНК цепью, а некоторые участки теломеразной РНК могут взаимодействовать с поверхностью, соответствующей кластеру I в TEN- домене. Величины констант диссоциации, приведенные в таблице 3.2, получены в результате большого объема экспериментов и, несомненно, они вносят существенный вклад в понимание функционирования TEN-домена не только в теломеразном комплексе *H.polyomorpha*, но и N-концевых доменов теломераз из всех организмов, в том числе человека. Основным выводом этого раздела диссертации является вывод о том, что TEN-домен может участвовать в ограничении длины гетеродуплекса при синтезе теломерного ДНК-повтора по матричной РНК.

В заключительном разделе работы, используя полученные результаты, О.А. Петрова предлагает модель полноразмерного комплекса обратной транскриптазы *H.polyomorpha* со связанным гетеродуплексом. Для построения модели была использована структура TEN – домена *H.polyomorpha*, установленная методом ЯМР- спектроскопии. Основная часть модели обратная транскриптаза, TERT ring и ДНК-РНК гетеродуплекс, связанный в центральной поре, моделировались с использованием структуры при использовании обратной транскриптазы *Tribolium castaneum*, последовательности матричной РНК и теломерной ДНК были заменены на соответствующие для *H.polyomorpha*. Положение фермента относительно TERT ring моделировалось на

основании данных ЯМР титрования - исследования связывание *in vitro* TEN-домена с фрагментами РНК и ДНК, моделирующими фрагменты теломеразной РНК и теломерной ДНК.

В модели N-конец TEN-домена расположен так, что он может взаимодействовать с теломеразной РНК и с теломерной ДНК. Предложенное в модели расположение TEN-домена благоприятно для полного разделения цепей гетеродуплекса. С-концевой домен обратной транскриптазы участвует в стабилизации неспаренных нуклеотидов ДНК. Модель согласуется с данными, предложенными для полноразмерного теломеразного комплекса человека и предложенный характер взаимодействия обратной транскриптазы *H.polyomorpha* с гетеродуплексом имеет сходство с известным для РНК-полимеразы II взаимодействием РНК-продукт – ДНК-матрица.

Как пожелания к обсуждению построенной модели можно отметить, что: 1) обнаружив два высококонсервативных участка N-концевого домена обратной транскриптазы - V-мотив – участок 109-125 и участок 136-139, О.А. Петрова не обсуждает возможную роль V-мотива; 2) на стр. 105 приведены остатки, могущие, по мнению автора, стабилизировать неспаренные нуклеотиды ДНК – здесь желательно было написать (или даже иллюстрировать) взаимодействие 4-х гидрофобных остатков с ДНК.

Большой объем экспериментальной работы выполнен с использованием современных методов различных дисциплин, таких, как биоинформатики, генетической инженерии, белковой химии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса, рентгеноструктурного анализа. Полученные в работе результаты свидетельствуют о высоком теоретическом и экспериментальном уровнях О.А. Петровой и вносят существенный вклад в понимание взаимоотношения структура – функция такого сложного и важного объекта, как теломеразный комплекс.

Результаты диссертационной работы опубликованы в отечественных и международных журналах, в том числе журналах с высоким рейтингом.

Диссертация написана хорошим языком, практически не содержит англицизмов и хорошо иллюстрирована. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Некоторые замечания, относящиеся к оформлению работы:

- 1) стр. 12 – в нескольких фразах следует писать, что экспрессируется не теломераза (компоненты теломеразы), а соответствующие гены;
- 2) стр. 59, 60 – неудачные выражения - «мутагенез» - следует писать «сайт-направленный мутагенез» и «мутационный анализ» - следует писать «анализ мутантных форм»;
- 3) на стр. 101 остатки, выбранные для сайт-направленного мутагенеза, находятся в кластере I, а не в кластере II;

- 4) стр. 105 вместо «...серинов, глутаминов и лизинов...» следует писать «остатков серина, глутамина, лизина»;
- 5) в списке литературы ссылки 135, 142 на работы в отечественных журналах приводятся в английском варианте.

Диссертационная работа О.А. Петровой полностью удовлетворяет требованиям, установленным в п.2 «Положения о присуждении учёных степеней в Московском Государственном Университете имени М.В.Ломоносова», а её автор, конечно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук.

Официальный оппонент

и.о. зав. лабораторией химических основ биокатализа

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

Российской академии наук (ИМБ РАН),

доктор химических наук, профессор

Татьяна Викторовна Демидкина

119991, г. Москва,

ул. Вавилова, д. 32. ФГУБУН ИМБ РАН

Тел. 7 (499) 1359858

E-mail: tvd@eimb.ru

27 апреля 2018г.

Подпись проф., д.х.н. Т.В. Демидкиной

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГУБУН ИМБ РАН

к.в.н. А.А. Бочаров

