

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Петровой Ольги Алексеевны «Структурные исследования компонентов теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha*», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.10 – биоорганическая химия и 03.01.03 – молекулярная биология.

Рецензируемая работа посвящена структурным исследованиям компонентов рибонуклеопротеидного комплекса – теломеразы дрожжей *Ogataea polymorpha*, отвечающего за механизм поддержания длины повторяющихся последовательностей нуклеотидов на 3'-конце хромосомной ДНК, получивших название теломер. Теломераза представляет собой сложный комплекс, включающий обратную транскриптазу (TERT), каталитическую субъединицу и теломеразную РНК, содержащую матричный участок для удлинения ДНК. Также в процессе поддержания длины теломер *in vivo* в клетке необходимо присутствие ряда белков, необходимых для сборки, локализации и активности теломеразы. Короткие теломеры вызывают клеточное старение. В человеческих клетках укорочение теломер и, в конечном итоге, сенесценс, приводят к ограничению потенциала деления клетки. Имеются данные, что активация теломеразы связана с развитием рака, и что она активна в клетках, обладающих потенциалом к неограниченному делению, поэтому теломераза может быть мишенью, которую можно использовать при разработке антираковой терапии. Для создания инструментов, позволяющих управлять селективностью теломеразы, необходимо понимание работы всех её компонентов на молекулярном уровне, однако на сегодняшний момент информации о структуре компонент теломеразы довольно мало, что объясняется низкой стабильностью её компонентов. Наиболее важной для фармакологии является информация о структуре теломеразного комплекса человека, однако на данный момент есть лишь данные электронной микроскопии с разрешением 23 Å. Получить TERT в растворимой форме в

количестве, достаточном для кристаллизации – довольно сложная задача, что затрудняет структурные исследования этого белка. Структура каталитической субъединицы *Tribolium castaneum* была решена методом кристаллографии, однако в ее составе не содержится TEN-домена. Также методом кристаллографии была решена структура N-концевого домена TERT теломеразы реснитчатых *Tetrahymena thermophila*, но степень гомологии последовательности TEN реснитчатых значительно ниже последовательностей TEN других видов, включая млекопитающих и дрожжей. По этой причине структурные исследования белковых компонентов теломеразы дрожжей несомненно является актуальной задачей, поскольку позволит перейти к более высокому разрешению структуры TEN домена теломеразы человека.

Диссертационная работа Петровой О.А. построена по традиционной схеме и состоит из списка использованных сокращений, введения, двух глав, выводов, материалов и методов, списка литературы и приложения.

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены методы и объекты исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором изложены основные положения о структуре и функциях компонентов теломеразы, а также проведено сравнение структур дополнительных компонентов теломеразного комплекса реснитчатых, человека и дрожжей. Автор проделал анализ большого объема имеющейся информации, сопроводил текст большим количеством ссылок (124 в первой главе), и привел подробные иллюстрации, что дает достаточное представление о существующей на данный момент информации о структуре теломеразного комплекса различных организмов.

Вторая глава диссертационной работы содержит основные результаты исследования. Первоначально была проведена идентификация генов дополнительных белковых компонентов теломеразы дрожжей *H. Polymorpha*. С

помощью биоинформатического подхода были идентифицированы гены белков hpEst1, hpEst3 и подтверждена взаимосвязь гена-кандидатов белков с системой поддержания длины теломер. Для указанных белков было подтверждено наличие сенесценс фенотипа в дрожжах с удалёнными генами Est1 и Est2, а также укорочение теломер в ряду поколений в дрожжах с удалёнными геномами на основе анализа длины рестрикционных фрагментов теломер с помощью Саузерн-блот анализа. Далее автором описывается разработанный протокол выделения белков hpEst1 и hpEst3, пригодных для структурных и функциональных исследований. Оказалось, что белок hpEst1 в *E.coli* экспрессируется в очень малом количестве и не удовлетворяет требованиям для структурных исследований. Автор предполагает, что это может быть обусловлено достаточно большой молекулярной массой белка и его неструктурированностью, так как в клетках дрожжей могут быть недостающие в *E.coli* условия и компоненты, необходимые для правильного сворачивания белка. Кроме того, возможно наличие пост трансляционных модификаций, отсутствие которых при экспрессии в *E.coli* привели к невозможности получения белка hpEst1 в достаточном количестве. Белок hpEst3 напротив экспрессировался с высокой концентрацией, был гомогенен и полностью удовлетворял всем требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований. Далее структура данного белка была решена методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Также в данной главе автором был произведен поиск доменов каталитической субъединицы hpTERT дрожжей *H. polymorpha* и решена структура N-концевого домена hpTERT (hpTEN) методом кристаллографии и методом спектроскопии ЯМР. Полученные структуры обладали хорошей сходимостью (RMSD в коровой части белка 0.80 Å) и взаимодополняли друг друга, что свидетельствует о достоверности полученных данных. Так, участки с 30 по 32 и с 83 по 96 аминокислотный остаток присутствовали только в структуре ЯМР, а участок 71–82 лучше упорядочен в кристаллической структуре. Далее было проведено сравнение полученной новой структурной информации для hpTEN и ttTEN и показано, что

несмотря на невысокую степень гомологии в аминокислотной последовательности, структуры hpTEN и ttTEN обладают схожим структурным кором, состоящим из α/β структур с центральным α -спиральным мотивом. В заключение главы приводится анализ взаимодействия hpTEN с нуклеиновыми кислотами на основе анализа спектров ^1H - ^{15}N HSQC белка hpTEN при титровании фрагментами РНК и ДНК. В результате была предложена модель функционирования hpTERT, что обуславливает практическую значимость работы.

К работе нет замечаний принципиального характера, которые повлияли на общую высокую оценку уровня проведенных исследований и достоверности полученных результатов. Тем не менее, есть несколько замечаний.

1. В разделах 3.4 и 3.6.2., посвященных структурным исследованиям белков hpEst3 и hpTEN методом спектроскопии ЯМР приведены рисунки со структурами семейства из 10 моделей, однако в тексте не приведено значений величин среднеквадратичного отклонения атомов основной цепи белка (RMSD) в ангстремах, что затрудняет проводить оценку качества решенных структур.
2. В разделе 3.6.5 посвященном изучению взаимодействия hpTEN с нуклеиновыми кислотами используется неудачный термин «гетероядерное ЯМР титрование», под которым автор подразумевает анализ изменения величин химических сдвигов в гетероядерных спектрах ЯМР ^1H - ^{15}N HSQC белка hpTEN при титровании фрагментами РНК и ДНК. Также неосвященными остались вопросы: изменялись ли в спектрах ЯМР интенсивности сигналов белка при титровании, в каком диапазоне скоростей происходил обмен? Также неизвестно какой был выбран шаг титрования, а указан лишь верхний предел (до 5-10 кратного молярного избытка над белком).

Высказанные замечания не затрагивают основных положений, защищаемых автором и не снижают ценности проведенного исследования и

высокого качества представленной диссертационной работы. Диссертация производит впечатление законченного исследования, основанного на объемной и тщательно выполненной экспериментальной работе. Ее результаты могут быть использованы в организациях, занимающихся структурными исследованиями биомолекул, например, в Институте Белка РАН (Пущино), ИБХ РАН (Москва), ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Биологический факультет СПбГУ и других научных центрах. Основные результаты апробированы на научных конференциях различного уровня и опубликованы в рецензируемых научных журналах. Содержание работы в полной мере отражено в автореферате.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Петровой Ольги Алексеевны «Структурные исследования компонентов теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha*» полностью удовлетворяет требованиям, установленным в п.2 «Положения о присуждении учёных степеней в Московском Государственном Университете имени М.В.Ломоносова», утверждённого ректором Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова 27 октября 2016 года, а её автор, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.10 – биоорганическая химия и 03.01.03 – молекулярная биология.

К.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник,
руководитель научно-исследовательской
лаборатории структурной биологии
института фундаментальной медицины и
биологии Казанского (Приволжского)
федерального университета

Усачев К.С.



30 апреля 2018г.

Подпись К.С. Усачева
Вер документально введ. уч.

Г.Г.Фатхуллина