

О Т З Ы В

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, 03.01.03 – молекулярная биология

Представленная к защите работа Петровой О.А. посвящена структурному исследованию теломеразного комплекса его компонентов из термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha*. Основной проблемой в структурных исследованиях больших ферментных комплексов в клетке является сложность их выделения в стабильном виде. Это наблюдение полностью относится и к теломеразному комплексу. Хорошо известно, что белки из термостабильных организмов обычно более стабильны своих нетермостабильных аналогов. Этот факт и был использован автором в качестве основы своей диссертационной работы. В качестве объекта исследований был выбран термотолерантный штамм дрожжей *Ogataea polymorpha* (*Hansenula polymorpha*).

Работа изложена на 167 (в автореферате 166) страницах, включая страницы со списком литературы и приложениями, и содержит 52 рисунка, не включая Приложения, и 2 таблицы. Она построена по следующему принципу и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Результатов и их обсуждение», включая главу «Заключение», «Выводы», «Материалы и методы исследования», «Список литературы», а также дополнительный раздел «Приложение». Литературный обзор занимает треть от общего объема диссертации и включает в себя обзор современного состояния исследований в области изучения теломеразного комплекса и его структуры. Достаточно подробно описаны основные компоненты теломеразного комплекса: структура и механизм действия теломеразной обратной транскриптазы TERT, теломерная РНК. Отдельно представлена информация о дополнительных компонентах теломеразного комплекса белках CDC13, Est1 и Est3. В целом обзор современной литературы демонстрирует уровень сложности материала, с которым столкнулся автор. Количество ссылок 164, большая часть относится к работам последнего десятилетия. Раздел «Материалы и Методы исследования» составляет немногим менее 15% от общего объема диссертации, однако подробно описывает как стандартные процедуры, использованные при проведении исследований, так и совершенно новые, разработанные автором в ходе выполнения исследований. Раздел «Результаты и обсуждение» занимает основную долю в общем объеме диссертации.

В ходе исследований автором впервые были получены дополнительные белковые компоненты теломеразы дрожжей *H.polyomorpha* Est1 и Est3. Однако, только для Est3 был проведен анализ физико-химическими методами: спектроскопией кругового дихроизма, термофлюориметрии и динамическим светорассеянием. Для него же были получены замещённые производные, содержащие ¹⁵N или ¹⁵N¹³C, и установлена пространственная структура. Анализ полученных данных показал, что структура hpEst3 обладала высокой степенью структурной гомологии с ранее полученной структурой Est3 *S.cerevisiae* (scEst3). Дополнительно установлена гомология со структурой OB-fold теломерных белков TPP1 человека и структурой TEBPβ реснитчатых *O.pova*, это позволило выдвинуть гипотезу, об эволюционной связи белков Est3, TPP1 и TEBPβ.

Другим достижением автора является определение структуры TEN-домена hpTERT двумя разными методами: рентгеновской кристаллографии и с использованием спектроскопии ЯМР. Сравнение «замороженной» в кристалле структуры и структуры в растворе, совместно с анализом множественных выравниваний последовательностей на основе полученной структуры, позволило определить консервативные структурные элементы, которые играют важную роль в функции TEN домена.

В завершении автором охарактеризовано взаимодействие hpTEN с нуклеиновыми кислотами, моделирующими участки теломеразной РНК, теломер и их комплекса. Совместно с данными структурного анализа была предложена модель hpTERT и предложена гипотеза, согласно которой домен TEN может ограничивать размер длины гетеродуплекса между матричным участком TER и теломерной ДНК при синтезе повтора, что может способствовать разделению цепей, необходимому для транслокации РНК и процессивности при добавлении теломерных повторов.

Работа выполнена на высоком экспериментальном и научном уровнях. Однако содержит ряд замечаний и недостатков:

Одним из безусловных достижений автора является получение ЯМР и кристаллических структур домена TEN. Для одного из важнейших дополнительных компонентов теломеразной системы – белка Est3 получена только ЯМР структура. Является ли отсутствие кристаллической структуры Est3 свидетельством его высокой динамической подвижности, что препятствует формированию кристалла с регулярной структурой или автор не ставил перед собой задачу получения данных рентгеноструктурного анализа?

Также, более полная информация о функции компонентов теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polyomorpha* могла быть получена при наличии данных о

структурах полноразмерного белка TERT и Est1, предпринимались ли попытки провести такие эксперименты?

Незначительными недостатками, не влияющими на научные выводы работы, является некорректное написание аминокислотных остатков «серин», «треонин» вместо «остаток серина», «остаток треонина»; а также невысокое качество исполнения иллюстраций. В частности, недостаточное разрешение рисунков 3.4, 3.7, что затрудняет анализ сделанных автором утверждений.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных статьях, опубликованных автором в ведущих российских и зарубежных журналах, результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

Диссертационная работа Петровой О.А. полностью соответствует требованиям, установленным в пункте 2 «Положения о присуждении учёных степеней в Московском Государственном Университете имени М.В.Ломоносова», а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальностям: 02.00.10 – биоорганическая химия и 03.01.03 – молекулярная биология.

Врио заместителя директора по научной работе

Главный научный сотрудник

Отдела пептидно-белковых технологий

Федерального государственного

бюджетного учреждения науки

Институт биоорганической химии

им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

д.х.н.

117997, Россия, г. Москва,

Ул Миклухо-Маклая, 16/10

Тел. (495) 727-38-60

E-mail: smirnov@mx.ibch.ru

Смирнов Иван Витальевич

Подпись д.х.н. Смирнова И.В.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИХ РАН

доктор физ.-мат.наук

Олейников В.А.



МП

«07» мая 2018 года