

Отзыв официального оппонента о диссертации А.Н. Малявко
«Регуляция длины теломер *Hansenula polymorpha*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Значительная часть живых организмов, в том числе млекопитающие и человек, имеют линейно организованные хромосомы. Стабильное воспроизводство генетического материала при такой топологии требует особой организации концевых участков хромосом – теломер для их защиты от потери последовательностей на концах ДНК в процессе репликации и от нежелательных рекомбинационных событий. Многие белковые компоненты, участвующие в поддержании структуры теломер, достаточно консервативны, однако конкретные механизмы их участия в этом процессе могут сильно отличаться у разных организмов. Диссертация А.Н. Малявко посвящена изучению механизмов контроля длины теломер у термотолерантных метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*. Представления о репликации теломер у дрожжей в существенной степени основываются на работах, выполненных на более традиционном модельном объекте *Saccharomyces cerevisiae*. Выбор в качестве модельного организма *H. polymorpha* был связан с его эволюционной удаленностью от *S. cerevisiae* при том, что этот объект почти такой же удобный, с точки зрения доступности для молекулярно-генетических манипуляций. С другой стороны, у коллектива, в котором работал А.Н. Малявко, были данные о том, что матричный участок теломеразной РНК *H. polymorpha* может простирается на один нуклеотид дальше (до позиции A170), чем последовательность предсказанная на основании анализа последовательностей теломер этого организма. Эти обстоятельства определили выбор модельного объекта и направления исследований, проведенных в ходе выполнения диссертационной работы. Этот выбор представляется вполне обоснованным, а задачи, поставленные в работе, весьма актуальными. В частности, в задачи работы входило определить происходит ли обратная транскрипция матричного участка до позиции 170 *in vivo* и как это сказывается на длине теломер. Также в работе были исследованы проявления делеций генов *H. polymorpha*, кодирующих гомологи теломерных белков Rap1, Rif1, Tell и Mre11 *S. cerevisiae*. Автором было убедительно

продемонстрировано, что теломеры *H. polymorpha* содержат на 3'-конце нуклеотид, присоединяющийся в результате обратной транскрипции теломеразной РНК до положения 170. Было показано, что присутствие этого нуклеотида блокирует возможность дальнейшего удлинения 3' конца хромосомы теломеразой, поскольку он оказывается не комплементарным матричному участку теломеразной РНК при репозиционировании. Важной частью работы является анализ генов *H. polymorpha*, кодирующих гомологи теломерных белков *S. cerevisiae*. Было обнаружено, что инактивация гена, кодирующего гомолог Rif1, приводит к увеличению длины теломер. Однако в случаях инактивации трех других генов, кодирующих гомологи Rap1, Tel1 и Mre1, изменения длины теломер обнаружено не было. В экспериментах по иммунопреципитации хроматина были получены данные, указывающие на специфическое связывание гомологов Rap1 с теломерными последовательностями.

Работа написана по классическому плану и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Результаты и обсуждение», «Материалы и методы», «Выводы». В разделе «Обзор литературы» подробно описаны основные сведения об известных на данный момент механизмах, участвующих в поддержании структуры теломер. В разделе «Результаты и обсуждение» изложены экспериментальные данные, полученные в работе, и заключения, которые можно сделать на их основе. В разделе «Материалы и методы» подробно изложены методики использованные в работе, что позволяет воспроизвести сделанные автором эксперименты.

Несмотря на общее положительное впечатление от диссертационной работы А.Н. Малявко, по поводу ряда ее аспектов могут быть сделаны замечания.

1. Стиль изложения нельзя назвать идеальным. Особенно это касается использования лабораторного жаргона. Таким терминам как "секвенирование", "сайт", "таг" нужно было найти литературные эквиваленты, хотя понятно, о чем идет речь. Использование термина "рид", по-видимому дало автору иллюзию того, что все понятно изложено и он не описал достаточно подробно, как эти "риды" получают, сославшись на название прибора и лабораторию, в которой этот анализ проводился. В этой части работы непонятно, почему нужны были только полные "риды" и почему их нужно было получать с двух праймеров.

Возможно, подробное описание того, как эти "риды" получались, прояснило бы ситуацию.

2. Процедура получения и анализа делеций генов, а также их замены на гены с участками, кодирующими гемагглютининовый эпитоп, описана недостаточно подробно для того, чтобы можно было легко понять, действительно ли проведенный анализ подтверждает правильность интеграции использованных конструкций. Для каждого случая нужна была схема модифицируемого локуса с указанием взаимного расположения праймеров для анализа интеграции и для амплификации интегрируемой кассеты. По крайней мере, в случае гомолога гена *RIF1* этот анализ был проведен не совсем корректно, поскольку при правильной интеграции продукт ПЦР не получался. В этом случае определенно нужно было использовать другие праймеры, которые давали бы продукт.

3. Автор дал исследованным в работе генам такие же названия, как и у их гомологов из *S. cerevisiae*. Это бывает оправдано, если есть уверенность в том, что функции гомологов совпадают. В случае гена *RIF1* это было обосновано, поскольку автор продемонстрировал его роль в контроле синтеза теломер. В других случаях это не было продемонстрировано. Более того, сам алгоритм поиска гомологов, описанный в работе, не выглядит полноценным, поскольку был проведен только поиск гомологов белков *S. cerevisiae* в базе последовательностей *H. polymorpha*. После этого для отобранных последовательностей *H. polymorpha* нужно было провести поиск в базе последовательностей *S. cerevisiae* для выявления действительно ближайшего гомолога.

4. Выводы 3, 4 и 6 сформулированы не очень удачно. В частности, вывод 3 правильнее было бы сформулировать так: "Инактивация генов *H. polymorpha*, кодирующих гомологи белков Rap1, Tel1 и Mre11 не оказывает влияния на длину теломер." А вывод 4 – так: "Делеция гена *H. polymorpha*, кодирующего гомолог белка Rif1 *S. cerevisiae*, приводит к увеличению длины теломер, как и инактивация гена *RIF1* у *S. cerevisiae*. Это указывает на то, что функции Rif1 *S. cerevisiae* и его ближайшего гомолога из *H. polymorpha* совпадают." Вывод 6 выглядит скорее как оценочное суждение, сделанное на основе других выводов, поэтому есть сомнение, насколько этот вывод нужно было включать. Термин "радикально" не дает количественного или какого-то объективного определения отличий и поэтому не нужен.

Сделанные замечания не умаляют высокого уровня проделанной А.Н. Малявко работы и научной значимости полученных им результатов. Диссертационная работа А.Н. Малявко "Регуляция длины теломер дрожжей *Hansenula polymorpha*" является самостоятельным законченным научным исследованием. Автор полностью справился с поставленной научной задачей. Приведенные в диссертации выводы обоснованы и соответствуют полученным экспериментальным данным. Результаты, полученные в работе, имеют большое научное значение и относятся к области биоорганической химии и молекулярной биологии. По уровню научных исследований и значимости работа полностью соответствует требованиям ВАК Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - "биоорганическая химия".

Ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной генетики
Федерального государственного
бюджетного учреждения
науки Институт биохимии им. А.Н.Баха
Российской академии наук
(119071, г. Москва,
Ленинский проспект, дом 33, стр. 2,
e-mail: inbi@inbi.ras.ru)

к.б.н.



Агафонов М.О.

27 ноября 2014 г.

