

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Сивкиной Анастасии Львовны
«Роль субъединиц и доменов комплекса FACT в разворачивании нуклеосом»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.3 – молекулярная биология

Из-за своего большого объема генетический материал эукариот не хранится в развернутом виде, а имеет плотную упаковку с минимальным уровнем компактизации – нуклеосомной частицей. Подобная компактизация значительно ограничивает доступность ДНК для белков нуклеинового обмена и играет важную роль в регуляции ДНК-зависимых процессов, таких как экспрессия генов, репликация и ответ на действие ДНК-повреждающих агентов. Нуклеосома представляет собой комплекс октамера гистонов, на который в 1.67 оборота намотана геномная ДНК. При сборке нуклеосомной частицы происходит последовательное связывание тетрамера гистонов H3/H4 и двух димеров гистонов H2A/H2B с ДНК-дуплексом. В отсутствие ДНК октамерный комплекс гистонов нестабилен и, соответственно, не может существовать как самостоятельная структура во время любого из клеточных процессов, требующих реорганизации хроматина. Соответственно, для сборки и, что важно, предшествующей ей разборке нуклеосомных частиц требуется помощь различных белков, механизм работы которых может быть как АТФ-зависимым, так и АТФ-независимым. К последним относится высоко консервативный белковый комплекс, гистоновый шаперон FACT, который принимает участие в процессе ремоделирования нуклеосом во время репликации, транскрипции и формирования клеточного ответа на повреждение ДНК.

Уровень экспрессии FACT вариативен и изменяется как в процессе дифференцировки клеток, так и при онкогенезе. Повышенный уровень экспрессии FACT обнаруживается в образцах клинических опухолей. Более того, опухоли с большей долей FACT-позитивных клеток, как правило, более агрессивны.

Несмотря на такую глубокую вовлеченность комплекса FACT в жизнь клетки и большое количество работ, посвященных исследованию функций этого гистонового шаперона, подробности механизма действия FACT при реализации его основной активности до сих пор остаются не вполне понятными. Таким образом, основная цель представленной диссертационной работы, заключающаяся в исследовании роли отдельных доменов комплекса FACT в процессе обратимой реорганизации нуклеосомных частиц, представляется весьма актуальной.

Для достижения поставленной цели автор использует современные физико-химические подходы – методы spFRET- и электронной микроскопии. Применение метода Ферстеровского

переноса энергии внутри одной молекулы, в данном случае нуклеосомной частицы, позволяет следить за глобальными изменениями структуры ДНК при реорганизации нуклеосомы комплексом FACT на мономолекулярном уровне. Метод электронной микроскопии, по сути, позволяет получить "молекулярный портрет" всех типов белок-нуклеиновых комплексов в процессе реорганизации нуклеосомной частицы. Сравнение результатов экспериментов по изучению динамики реорганизации частиц в растворе, полученной с помощью spFRET-микроскопии, с данными электронной микроскопии позволило автору предложить детальный механизм обратимой реорганизации нуклеосомной частицы комплексами FACT дрожжей и человека. Разворачивание нуклеосомной частицы в линейную форму в комплексе с FACT без потери гистонов показано впервые.

Работа Сивкиной Анастасии Львовны изложена на 125 страницах, содержит 31 рисунок, 5 таблиц, 11 приложений, список цитированной литературы включает 160 источников. Текст оформлен в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, приложений, списка сокращений и терминов, списка цитированной литературы.

Введение описывает актуальность решаемой научной работы, ее цели и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, положения, выносимые на защиту, а также личный вклад соискателя.

Обзор литературы разбит на четыре смысловые части, касающиеся описания структуры нуклеосомы – основного субстратного элемента исследуемого комплекса, а также структуры и функции всех компонентов, обеспечивающих АТФ-независимое ремоделирование нуклеосом в составе хроматина в клетках низших и высших эукариот – комплекса FACT дрожжей и человека. Отдельная часть обзора посвящена описанию данных о возможности использования комплекса hFACT в качестве мишени при терапии онкологических заболеваний. Литературный обзор написан достаточно компактно, но в целом дает общее представление о строении и известных функциях каждой отдельной субъединицы главного объекта исследования – комплекса FACT. Тем не менее, восприятие информации несколько затрудняет тот факт, что данные, непосредственно представляемые к защите, а именно все восемь работ из списка публикаций автора по теме диссертации, также описаны в литературном обзоре, например, ссылка 50 является ссылкой №5 из списка публикаций автора, и т.д. Это создает определенную двусмысленность при оценке обоснованности поставленных задач и интерпретации новизны полученных данных. Кроме того, часть литературных данных относительно результатов исследования механизма реорганизации субнуклеосом комплексом hFACT методом

криоэлектронной микроскопии приведена в разделе "Результаты и обсуждение" (стр. 88), что выглядит не вполне логично.

В главе "Обзор литературы" уFACT определен как гетеродимер Spt16/Pob3, при реализации шапероновой функции которого необходим белок Nhr6, но далее по тексту уFACT упоминается то как это комплекс трех белков Spt16, Pob3 и Nhr6, то как гетеродимер состава Spt16/Pob3 и Nhr6. Также в главе "Обзор литературы" отсутствует заключение, которое связало бы ее с последующими главами диссертационной работы.

Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание современных биохимических и физико-химических методов, использованных в работе. Для стороннего наблюдателя не составит труда воспроизвести большинство экспериментов по описанным методикам. Тем не менее, после прочтения раздела осталось несколько вопросов технического характера. Так, например, действительно ли в состав однократного буфера для экстракции из геля собранных нуклеосомных частиц входит БСА в концентрации 200 мг/мл? Чем обусловлена необходимость использования такой низкой концентрации глицерина – 2%, в буфере хранения? С какой целью в состав буфера для изучения комплексообразования FACT и нуклеосом включены 17 mM HEPES и 2 mM Трис?

При постановке экспериментов в присутствии комплекса уFACT и нуклеосом были использованы субмикромольные и микромольные концентрации белков, в 200 и более раз превышающие концентрации ДНК-субстрата. А известны ли значения констант диссоциации для комплексов уFACT и Nhr6 с нуклеосомами?

При постановке экспериментов по spFRET-микроскопии автор использует 30-100-кратный избыток H1 по отношению к нуклеосомному субстрата, а концентрации комплекса hFACT - еще на порядок выше. Оценивали ли в этом случае процесс формирования комплексов с использованием нативного гель-электрофореза? Видно ли формирование отдельных хроматосом? Наблюдается ли в этом случае формирование агрегатов?

При определении состава комплексов уFACT в смеси димера Spt16/Pob3 и Nhr6 автор использовал методику последовательного разделения белков в нативных и денатурирующих условиях. Возможно ли было упарить пробу для осуществления количественного переноса образца для проведения гель-электрофореза в денатурирующих условиях?

Чем обусловлен выбор температурного режима (30°C) при проведении реакций комплексообразования, например, Spt16/Pob3 и Nhr6, в том числе с нуклеосомой?

На стр. 53 описаны условия эксперимента, в которых проводили формирование комплексов hFACT с нуклеосомой, - инкубацию проводили на льду в течение 42 часов. Чем объясняется такая

динамика процесса, учитывая тот факт, что комплекс с конкурентный ДНК (по условиям проведения эксперимента) формируется в течение 30 мин на льду?

При изложении полученных результатов автор придерживается порядка поставленных в работе задач и последовательно описывает полученные с использованием методов ПЭМ и spFRET-микроскопии данные, характеризующие роль различных структурных доменов димера Spt16/Pob3 уFACT во взаимодействии с шапероном Nhr6 и нуклеосомной частицей, а также данные, демонстрирующие последовательность разворачивания нуклеосомной частицы комплексом hFACT в присутствии кураксина. В результате проделанной работы с использованием метода ПЭМ автором впервые было показано существование нескольких состояний белковых комплексов Spt16/Pob3/Nhr6 дрожжей и SPT16/SSRP1 человека – открытого, промежуточного и закрытого. Продемонстрирована роль С-концевых доменов в процессе поддержания комплекса уFACT в закрытом или открытом состоянии в составе белок-белкового комплекса уFACT/Nhr6, а также при взаимодействии комплекса уFACT/Nhr6 с нуклеосомой. С использованием метода ПЭМ впервые показано разворачивание нуклеосомной частицы комплексом уFACT/Nhr6 и комплексом hFACT в присутствии кураксина в линейную структуру. Продемонстрировано, что обусловленная взаимодействием с Nhr6 или кураксином частичная дестабилизация нуклеосомной структуры является необходимой для обеспечения эффективного связывания открытых комплексов димеров уFACT или hFACT с нуклеосомной частицей и ее последующего разворачивания в линейную форму. При этом репозиционирование гистонов осуществляется следующим образом: димеров H2A/H2B - посредством С-концевых доменов Spt16 и Pob3 уFACT и Spt16-MD&CTD и SSRP1-C hFACT; тетрамера H3/H4 – посредством Spt16-M уFACT и SSRP1-MD в открытом или Spt16-MD&CTD в линейном (развернутом) комплексах hFACT. За взаимодействие с нуклеосомной ДНК отвечают домены Spt16-D, Pob3-N/D&M, а также молекулы Nhr6 комплекса уFACT, и домены SPT16-DD&MD и SSRP1-NTD/DD&MD&HMG комплекса hFACT.

Несмотря на большой объем результатов и несомненные достоинства работы, при прочтении этой главы диссертации возник ряд вопросов, часть из которых носит технический характер. Следует сразу сказать, что подписи к рисункам в этой главе текста диссертации недостаточно детальны, что несколько затрудняет интерпретацию результатов экспериментов. Возможно, доскональное знание условий конкретного эксперимента сняло бы многие вопросы. Кроме того, кажется уместным приведение иллюстративного материала на языке текста диссертации.

При обсуждении результатов эксперимента по изучению стехиометрии комплексов Spt16/Pob3 и Nhr6 на стр. 57 сказано: "Анализ взаимодействия Nhr6 и FACT в нативных условиях показал, что комплексы Spt16/Pob3 и Spt16/Pob3+Nhr6 сильно отличаются по

подвижности (Рисунок 13А, Б), но не по массе...", что представляет собой не совсем логичное объяснение, поскольку на основе анализа электрофореграмм EMSA ничего нельзя сказать об абсолютной массе комплекса, изменение электрофоретической подвижности в большей степени отражает изменение заряда и конформации, но не массы.

Из описания к рис. 13Б, стр. 58, неясно, какие мольные соотношения были использованы для получения комплексов трех белков.

Из описания к рис. 13В, стр. 58, неясно, каково относительное количество димера уFACT в составе каждого из анализируемых комплексов.

Из описания эксперимента, приведенного на стр. 59, неясно, с чем связана необходимость проводить дополнительную очистку от непрореагировавшего Nhr6 после элюции тройного комплекса из нативного ПААГ. Согласно базе данных www.yeastgenome.org pI для Nhr6 составляет 10.4, соответственно, в условиях проведения эксперимента белок не должен мигрировать в нативном ПААГ в отсутствие ДНК-субстрата.

На стр. 59 сказано, что на гель "наносили 4 мкмоля FACT". Действительно ли были использованы такие количества белка? Кроме того, при описании эксперимента по определению стехиометрии комплекса FACT и Nhr6 не приведены первичные данные и не описано количественное распределение, поэтому вывод не совсем ясен.

Какие концентрации белков были использованы для получения набора комплексов уFACT с Nhr6 для ПЭМ-экспериментов (стр. 60)?

На стр. 60 сказано, что для каждого белкового комплекса было идентифицировано 112 классов с различными характеристиками. Не совсем понятно, на основе каких предположений (или допущений) были сформированы эти классы. Кроме того, в предыдущем разделе уже было показано, что взаимодействие уFACT с Nhr6 зависит от наличия С-концевых участков обеих субъединиц гетеродимера. Однако в списке (таблица в приложении Б) представлены не все варианты набора компонентов, из которых потенциально могут сформироваться исследуемые белковые комплексы, например, отсутствуют комплексы Nhr6 с делеционными мутантными формами уFACT, но присутствуют комплексы полноразмерных белков с нуклеосомой (NCP/уFACT/Nhr6). Чем обусловлен выбор именно таких сочетаний белок-белковых или белок-нуклеиновых комплексов для ПЭМ-экспериментов?

На стр. 68 приведено описание эксперимента по подбору мольного соотношения белков уFACT и Nhr6, при котором происходит эффективная динамика разворачивания структуры нуклеосом, и стоит ссылка на работу группы Феофанова 2016 г. Действительно ли до момента выполнения защищаемой работы никто не определял стехиометрию комплекса, при котором происходит эффективная динамика?

Почему для исследования полного разворачивания структуры нуклеосомы по принципу "все-или-ничего" комплексом уФАСТ в присутствии Nhr6 при конструировании субстрата были использованы ДНК-последовательности 57/112, а не 35/112? Эксперименты по spFRET-микроскопии с использованием нуклеосом, собранных на ДНК 57/112, будут достоверно отражать изменения (в данном случае не обязательно симметричные) в структуре только части нуклеосомной частицы, а именно движение спирали ДНК-дуплекса, расположенной вблизи exit/entry-сайта (стр. 69)? Какое именно предположение по архитектуре комплекса NCP/уФАСТ/Nhr6 было на момент начала исследований?

При описании эксперимента на стр. 70 возникает вопрос о константах диссоциации комплексов уФАСТ/Nhr6 и Nhr6/NCP: результаты экспериментов свидетельствуют в пользу того, что белковый комплекс (уФАСТ/Nhr6) более прочный, чем белок-нуклеиновый (Nhr6/NCP).

Какие именно предпосылки к реализации механизма формирования тройного комплекса (последовательность действий, что с чем взаимодействует) были взяты за основу при постановке эксперимента с титрованием нуклеосом шапероном Nhr6 и комплексом уФАСТ? Все определяется количеством комплекса, т.е. сродством компонентов друг к другу, и временем его жизни, что никак не обсуждается. Поскольку не было проведено титрования компонентов, условия эксперимента учитывают только два "крайних" состояния и не учитывает возможный сложный характер взаимодействия между компонентами.

Результат эксперимента, описанного на стр. 68, говорит о том, что 4-кратного избытка Nhr6 над уФАСТ достаточно для достоверного полного раскручивания нуклеосомного субстрата белковым комплексом, но на основании результатов эксперимента, изложенного на стр. 71, выбор падает на использование 10-кратного избытка Nhr6 над уФАСТ, что не совсем понятно. Почему выбор сделан был именно в пользу соотношения 10:1? Кроме того, такое соотношение (10:1) было уже использовано в работе 2016 г. Почему нельзя было провести однотипные эксперименты, чтобы учесть "вклад метода"?

Что означает предложение "можно предположить, что тройные белок-нуклеиновые комплексы обладают такой же гибкостью, что и двойные белок-белковые комплексы" (стр. 72)? Речь идет о возможности существования уФАСТ в линейной форме, независимо от партнеров - как в составе белок-белкового комплекса с Nhr6, так и в составе белок-нуклеинового комплекса с Nhr6 и нуклеосомой?

При микроскопии образцов белок-белковых комплексов увеличение площади пятен с повышенной электронной плотностью было объяснено ассоциацией Nhr6 с С-концевыми доменами уФАСТ (стр. 72). Можно ли в данном случае можно говорить о косвенной визуализации Nhr6? Если да, то почему при формировании тройных белок-нуклеиновых комплексов

(NCP/yFACT/Nhp6) Nhp6 перестал быть "виден"? Это вопрос дистанции между взаимодействующими пептидами? Или это связано с ограничениями метода?

Представленный на рис. 22 (стр. 75) механизм разворачивания нулеосомных частиц белком yFACT в составе тройного комплекса (Nhp6/NCP/FACT) не учитывает присутствия Nhp6 на первых этапах процесса. Тем не менее, поскольку в предложенной модели при взаимодействии с NCP yFACT должен иметь открытую конформацию, т.е. оставляющую С-хвосты свободными, а данные предыдущих экспериментов свидетельствуют о том, что в составе белок-белкового комплекса yFACT находится преимущественно в открытом состоянии и что эффективность раскручивания NCP напрямую зависит от концентрации Nhp6, то можно предположить, что порядок формирования тройного комплекса следующий: Nhp6/FACT, Nhp6/NCP, Nhp6/NCP/FACT.

Представление диаграмм, демонстрирующих распределение по количеству частиц с той или иной структурой (развернутой и пр.), при описании всех экспериментальных данных по spFRET-микроскопии существенно упростило бы восприятие этой части материала.

В описании к рис. 23 на стр. 77 говорится о том, что в отсутствие одного С-концевого домена наблюдается очень низкий процент частично развернутых комплексом yFACT/Nhp6 NCP-структур. Не может ли этот факт свидетельствовать в пользу того, что формированию комплекса yFACT/NCP или Nhp6/yFACT/NCP предшествует комплекс Nhp6/NCP, куда Nhp6 попадает из комплекса Nhp6/yFACT? В данном случае что означает "неправильное разворачивание нуклеосом" – альтернативное, отличающегося от такового в присутствии нативной формы yFACT? Что будет, если использовать мутантную форму yFACT, содержащую делецию С-концевого домена другой субъединицы?

На рис. 24, стр. 78, представлена общая модель разворачивания нуклеосомы комплексом Nhp6/yFACT. Согласно описанию, подготовленный комплекс yFACT связывает дестабилизированную нуклеосому, однако не уточняется, в какой момент она становится дестабилизированной. Не может ли полученная в экспериментах, проведенных автором, стехиометрия белковых компонент 1:4 быть "интегрирована" в эту модель, например, 2 молекулы Nhp6 необходимы для взаимодействия с двумя С-концевыми доменами димера yFACT для реализации открытой конформации и 2 молекулы - для взаимодействия с дуплексной частью ДНК в районе -/+7 SHL?

На стр. 80 приведено описание результатов эксперимента, полученных методом FRET-в-геле, однако описание самого метода в рукописи отсутствует.

Результаты эксперимента методом spFRET-EMSA, описание которого приведено на стр. 80, показали, что присутствие Nhp6 или yFACT не вызывает изменений в структуре тетрасом. Однако данные, полученные в присутствии только yFACT, не приведены. В строгом смысле

изменение подвижности комплексов в нативном ПААГ, наблюдаемое по положению флуоресцентной метки Cy5, не говорит об обратимости укладки тетрасомы.

На стр. 80 сказано, что "аффинность комплекса уФАСТ к тетрасоме сохраняется". Речь идет скорее о способности уФАСТ формировать комплекс с тетрасомой в отсутствие димеров H2A/H2B, поскольку непосредственно аффинность в эксперименте не определяли.

В эксперименте с хроматосомами (стр. 83) последние получали при использовании 50-100-кратного избытка H1 над концентрацией нуклеосом. Не наблюдается ли формирования агрегатов при таких соотношениях концентраций компонентов? Какой именно тезис иллюстрирует рисунок в приложении 3 на стр. 104?

На стр. 85 текста диссертации утверждается, что при делеции обоих С-концевых доменов уФАСТ гетеродимер теряет способность связываться с NCP, между тем данные spFRET-EMSA свидетельствуют в пользу формирования белок-нуклеинового комплекса NCP в присутствии Nhr6 и mutSpt16/Pob3, хоть и имеющего электрофоретическую подвижность (и, вероятно, конформацию), сопоставимую с подвижностью комплекса NCP/Nhr6. Кроме того, ниже в тексте диссертации приведены ссылки на литературные данные о том, что комплекс NCP с уФАСТ дикого типа не образуется. Поскольку данных, демонстрирующих отсутствие комплекса между NCP и mutSpt16/Pob3 (в качестве внутреннего контроля), на рисунке не представлено, а также отсутствует концентрационная зависимость комплексообразования NCP с используемыми белками, то такое утверждение в строгом виде не вполне обосновано, а носит лишь характер предположения.

На стр. 88 написано, что в разрешенной с помощью криоэлектронной микроскопии структуре комплекса уФАСТ с субнуклеосомой "нуклеосомная ДНК оставалась свернутой в спираль, тогда как в реорганизованной нуклеосоме ДНК должна быть развернутой". Вероятно, имеется ввиду отсутствие изменений третичной структуры ДНК-дуплекса в составе комплекса с уФАСТ, поскольку вторичная структура, а именно В-форма спирали ДНК, в работе не обсуждается.

Чем объясняется использование эквимольных соотношений hФАСТ и NCP в экспериментах по определению механизма разворачивания нуклеосом в присутствии кураксина (стр. 91)? В аналогичных экспериментах с дрожжевым аналогом были использованы 200-кратные избытки белка. Данных о значениях констант диссоциации комплексов не приведено. Кроме того, предполагается, что механизм разворачивания комплексом hФАСТ аналогичен механизму, реализуемому уФАСТ.

На рис. 29Б, стр. 92, отсутствует "внутренний" контроль частот распределения пула нуклеосом по E_{PR} для образца NCP и образца NCP с кураксином.

На электрофореграмме (Приложение И) при взаимодействии уФАСТ с NCP в присутствии кураксина видна только полоса свободной ДНК, а суммарный комплекс не детектируется. На

этой же фореграмме отсутствуют продукты разделения компонентов смеси NCP-yFACT-кураксин-конкурентная ДНК. Тем не менее, профиль E_{PR} , построенный по результатам экспериментов по spFRET-микроскопии, говорит о наличии в смеси компактизованных нуклеосомных частиц в присутствии yFACT, кураксина и конкурентной ДНК, однако не приведен объем выборки. Таким образом, нельзя сказать, насколько "достоверно" существует комплекс NCP/yFACT в присутствии кураксина и насколько эффективно происходит разворачивание и компактизация.

Представленная на рис.31, стр. 97, модель разворачивания нуклеосом с помощью hFACT основана на частичной дестабилизации белок-нуклеиновых взаимодействий в районе exit/entry-сайта. Тем не менее, кураксин взаимодействует с ДНК неспецифически. Важно ли место взаимодействия молекулы кураксина с ДНК в составе нуклеосомы для реализации представленного механизма? Известно, что при связывании с HMG-белками время жизни дестабилизированного состояния нуклеосомы больше, чем время жизни самого белок-нуклеинового комплекса. И есть предположение, что нуклеосом-связывающие белки могут взаимодействовать с уже дестабилизированной структурой нуклеосомы после диссоциации HMG. При взаимодействии комплекса hFACT с дестабилизированной кураксином нуклеосомой важно присутствие самого кураксина в составе комплекса? Что известно о времени жизни комплекса кураксин/нуклеосома? Где в представленной модели взаимодействия hFACT с NCP располагается HMG- и CID-домены шаперона? За счет каких молекул (или сил) инициируется связывание hFACT с нуклеосомой и ее раскручивание в нативной системе, в отсутствие кураксина? Какой из приведенных на рисунке комплексов hFACT отражает его компактное состояние? Чем оно отличается от закрытого?

На стр. 98 текста диссертации упоминается взаимодействие Nhrb с yFACT. Между тем подобное взаимодействие показано (методом ПЭМ) только для белок-белкового комплекса, но не для белок-нуклеинового – в составе последнего описано взаимодействие Nhrb только с нуклеосомной ДНК. Возможно, стоит уточнить формулировку.

На стр. 98 написано, что "сам по себе Nhrb или кураксин... практически не влияет на структуру интактной нуклеосомы". Это не вполне корректное выражение, поскольку взаимодействие этих молекул с нуклеосомой приводит к дестабилизации последней. Возможно, более корректно будет говорить об отсутствии изменения состава NCP (или отсутствии потери гистонов из состава NCP при взаимодействии с Nhrb или кураксином).

Несмотря на приведенный список вопросов, в целом интерпретация результатов, предложенная автором, логична и аргументирована, выводы обоснованы и соответствуют полученным результатам.

В работе имеются орфографические ошибки, неудачные выражения, жаргонизмы и стилистические неточности, что не снижает общей ее ценности и не влияет на окончательную оценку.

Подводя итог, без сомнения можно сказать, что результаты представленной работы являются важным шагом в изучении проблемы обратимой реорганизации минимальной структурной единицы эукариотического генома – нуклеосомы. Экспериментальные данные представляют значительную ценность для молекулярной биологии, биохимии и смежных наук. Основные результаты работы опубликованы в виде 8 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, а также представлены на 22 российских и международных конференциях.

Содержание автореферата соответствует основным положениям, выносимым на защиту.

Таким образом, диссертационная работа Сивкиной Анастасии Львовны «Роль субъединиц и доменов комплексов FACT в разворачивании нуклеосом», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология (по биологическим наукам), является законченной и соответствует всем требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Диссертация оформлена в соответствии с приложениями №5 и 6 Положения о диссертационных советах Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, а ее автор Сивкина Анастасия Львовна, безусловно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Белоусова Екатерина Анатольевна,

к.х.н., с.н.с. лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), 630090 г. Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, д. 8. Тел.: +7 (383) 363-51-96, e-mail: rina@niboch.nsc.ru;

21 ноября 2022 г

Подпись Белоусовой Е.А. заверяю
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.х.н.



Новопашина Д.С.