

## **ОТЗЫВ официального оппонента**

**на диссертационную работу Софьи Семеновны Марьясиной на тему:  
«Структура и функции белка WBSCR27, ассоциированного с синдромом  
Вильямса», представленную на соискание ученой степени кандидата  
химических наук по специальностям 1.4.9 — «биоорганическая химия»  
и 1.5.3 — «молекулярная биология»**

Определение пространственного строения биологических макромолекул приближает к пониманию их функций и представляет собой один из ключевых элементов современных стратегий поиска новых биологически-активных соединений, позволяющих создавать подходы и методы регулирования активности биомишеней. Метилтрансферазы объединяют большое количество ферментов, осуществляющих метилирование ДНК, РНК, белков и низкомолекулярных соединений, что жизненно необходимо для нормального функционирования клеток, а нарушения процессов метилирования ассоциировано с развитием многих заболеваний. Соответственно, изучение строения белка WBSCR27, который, как было показано в настоящем диссертационном исследовании, может быть отнесен к семейству метилтрансфераз, представляется весьма актуальным.

В ходе выполнения диссертационной работы С.С.Марьясиной впервые удалось, используя метод ЯМР, определить пространственную структуру и динамические свойства белка WBSCR27 в свободной форме и в комплексе с SAH. Апо-форма WBSCR27 имеет каноническую укладку Россмана, типичную для большинства метилтрансфераз класса I, а связывание SAH приводит к образованию трёх дополнительных  $\alpha$ -спиралей на неупорядоченном в апо-форме N-конце белка. Белок WBSCR27 близок к метилтрансферазам (его ближайшими гомологами являются метилтрансферазы, осуществляющие метилирование 18S рРНК, триметилирование лизина в составе белка EEF1A, а также синтез бетаина) и эффективно расщепляет SAM с образованием SAH. Впервые проведен поиск акцепторов метильной группы для этой метилтрансферазы, а также определена

стабильность белка WBSCR27 как в свободном состоянии, так и в комплексе с его субстратами. Установлено, что белок WBSCR27 обладает еще и слабой нуклеозидазной активностью. Все это однозначно свидетельствует о научной новизне и оригинальности диссертационной работы С.С.Марьясиной.

Диссертационная работа С.С.Марьясиной построена по традиционной схеме и включает в себя: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты, обсуждение результатов, выводы и список литературы, состоящий из 184 статей и обзоров, подавляющее большинство из которых опубликовано после 2000 г. Диссертационная работа хорошо написана, она занимает 140 стр., содержит 73 рисунка и 13 таблиц.

Литературный обзор занимает 36 стр., логично построен, хорошо оформлен, органически связан с темой диссертационной работы и состоит из четырех глав. Используемая С.С.Марьясиной схема изложения последовательно подводит читателя к собственно диссертационному исследованию и позволяет оценить новизну проделанной автором работы. К очевидным достоинствам следует отнести то, что автор не только творчески и критически описывает литературные данные, но и, анализируя их, намечает перспективные направления исследований в данной области. Полагаю, что эту часть диссертационной работы целесообразно опубликовать в виде отдельной статьи, так как обзоры подобной полноты в отечественной литературе отсутствуют.

Набор методов, которые были использованы С.С.Марьясиной при выполнении диссертационной работы, впечатляет и охватывает широкий круг разнообразных методов молекулярной биологии, использованных для поиска субстратов метилазы WBSCR27 (стр. 86-95), а также методы биоорганической химии, позволившие ей получить SAM и SAH, меченные стабильными изотопами водорода, углерода и азота. Следует особо отметить профессиональное владение различными вариантами ЯМР-спектроскопии, которое позволило С.С.Марьясиной решить структурно-функциональные задачи диссертационной работы. Подобная широта подходов и универсальность

достаточно редки и характеризуют С.С.Марьясину как вполне сложившегося ученого с большим творческим потенциалом.

Глава «Результаты» состоит из 5 частей и построена по нарастающей. На первом этапе с помощью pBLAST был проведен анализ аминокислотной последовательности, который позволил отнести WBSCR27 к метилтрансферазам. Затем был проведен всесторонний поиск акцепторов метильной группы с использованием целого арсенала методов молекулярной биологии, а методами ЯМР исследованы комплексы WBSCR27 с SAM, SAH, метилтиоаденозином и 5'-дезоксаденозином. Наконец, используя различные варианты ЯМР-спектроскопии была исследована динамика белка WBSCR27 и конформационные перестройки белковой глобулы, происходящие в ходе превращения SAM в SAH. Следует отметить, что эта часть диссертации изобилует не только оригинальными результатами, некоторые из которых перечислены в начале Отзыва, но и методическими находками. Например, рефолдинг WBSCR27, метод получения  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  равномерно меченного SAH (стр. 55), доказательство стереоспецифичности WBSCR27-реакции (стр.109-110, Рис. 62), и т.д. Отличительной особенностью главы «Результаты» является то, что каждый раздел начинается с постановки локальной задачи и заканчивается кратким выводом. Подобное построение разделов облегчает восприятие результатов, позволяет легко составить общую картину работы.

В заключение С.С.Марьясина, суммируя и логически анализируя полученные результаты, формулирует выводы, которые основываются на полученных экспериментальных данных, однозначно из них следуют и вполне соответствуют поставленным задачам и целям. Автореферат соответствует содержанию диссертации. Основной материал диссертации опубликован в 3-х статьях в зарубежных журналах, структуры апо-формы белка WBSCR27 и его комплексов с SAH депонированы в 4-х международных базах данных, а результаты работы были представлены на 19-ти всероссийских и международных конференциях.

Принципиальных замечаний по работе нет, однако, при прочтении диссертации возник ряд вопросов и комментариев.

- ✓ Стр.7 – «Большое количество заболеваний человека связано с нарушениями в работе МТаз, среди них ... синдром Вильямса» – какие изменения происходят с уровнем метилирования ?
- ✓ Большая часть диссертационного исследования посвящена поиску акцепторов метильной группы. Для это был использован впечатляющий набор методов молекулярной биологии. Некоторые из них подробно описаны, а в ряде случаев указано, что эксперимент выполнялся в соответствии с протоколом производителя. Однако описание эксперимента, в котором была предпринята попытка фотохимически сшить 4-тиоуридин обогащенную РНК и белок WBSCR27 описан так, что его невозможно воспроизвести: не указана длина волны облучения и его продолжительность, нет данных об интенсивности светового потока (стр.91-92).
- ✓ Метод получения  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$  равномерно меченого SAH совершенно неожиданный и оригинальный. Белок WBSCR27 выделяется из *E. coli* в виде смеси из двух комплексов – WBSCR27/SAM и WBSCR27/SAH в соотношении 1:2.7. Возможно ли, используя данный протокол (стр. 55) получать еще и  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$  равномерно меченый SAM ? В высшей степени желательно сравнить этот метод (преимущества и недостатки) с описанными в литературе методами выделения SAH из природных источников.
- ✓ В тексте диссертации встречаются и отдельные не совсем четкие формулировки. Например, в подписи к рис. 62 (стр. 110) при описании химического синтеза  $^{13}\text{CH}_3$ -меченого SAM из SAH указано, что: «(R,S)-SAM, получается в качестве побочного продукта». Подобное описание реакции метилирования, которая *a priori* не стереоспецифична представляется не совсем удачным, так как в реакции образуются два равнозначных продукта (R,S)- и (S,S)-SAM.

Указанные замечания никак не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным

Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальностей 1.4.9 – «биоорганическая химия» (по химическим наукам) и 1.5.3 – «молекулярная биология» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям №№ 5 и 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Марьясина Софья Семеновна, безусловно заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «биоорганическая химия» (химические науки) и 1.5.3 – «молекулярная биология» (химические науки).

Официальный оппонент:

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически-активных соединений  
ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Хомутов Алексей Радиевич

19 сентября 2022 г.

Контактные данные:

тел.: +7 (916) 847-84-70, e-mail: [alexkhom@list.ru](mailto:alexkhom@list.ru)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.03 – «молекулярная биология»,

Адрес места работы:

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Тел.: +7 (499) 135-60-65; e-mail: [ISINFO@imb.ru](mailto:ISINFO@imb.ru)