

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Марьясиной Софьи Семеновны
на тему: «Структура и функции белка WBSCR27,
ассоциированного с синдромом Вильямса»
по специальностям 1.4.9 — «биоорганическая химия»
и 1.5.3 — «молекулярная биология».

Диссертация Марьясиной Софьи Семеновны посвящена всестороннему изучению белка WBSCR27. Для белка WBSCR27 на момент начала работы не была известна ни структура, ни функция, несмотря на его вовлеченность в развитие редкого генетического заболевания, синдрома Вильямса. Исследования структуры и функции белков являются одной из важнейших задач современной биологии и фармакологии по ряду причин. Во-первых, они необходимы для установления взаимосвязи структура-функция, что, в свою очередь, требуется для дальнейшего развития алгоритмов предсказания свойств белков, в том числе на основе машинного обучения. Во-вторых, такие работы позволяют осуществлять рациональный поиск новых лекарств на основе пространственной структуры белка-мишени. Таким образом, и **актуальность**, и **новизна** работы не вызывают сомнений и обусловлены в первую очередь выбором объекта исследования.

Работа построена по стандартной схеме и состоит из Введения, четырех глав: Обзора литературы, Экспериментальной части, Результатов и Обсуждения, и Выводов. Объем диссертации составляет 141 страницу, работа содержит 73 рисунка и 13 таблиц, список литературы содержит 184 наименования.

Во *введении* обсуждается актуальность, новизна, практическая и теоретическая значимость результатов работы, апробация результатов и формулируются основные положения, выносимые на защиту.

В *первой главе* приведен объемный обзор литературы по теме диссертации. Глава разделена на четыре части, в которых приводятся литературные данные по биологическому метилированию, синдрому Вильямса, непосредственно белку WBSCR27, а также по методам исследования метилтрансферазной активности белков. Обзор легко читается, а приведенных в нем данных достаточно для понимания мотивации и актуальности задач, решаемых в рамках представленной диссертации.

Во *второй главе* приведено максимально полное описание методов, использованных при проведении исследования. Необходимо отметить, что набор методов разнообразен и полностью адекватен поставленным в диссертации задачам и целям. Для исследования структуры и динамики WBSCR27 была применена ЯМР-спектроскопия высокого разрешения, а для определения функции белка использовался широкий набор подходов, в том числе генная и белковая инженерия, ко-иммунопреципитация, аффинная хроматография, масс-спектрометрия, флюоресцентные методы, микроскопия. В части ЯМР-спектроскопии были применены наиболее современные подходы, в том числе селективное изотопное мечение метильных групп и определение остаточных констант диполь-дипольного взаимодействия в трех типах анизотропных сред.

В *третьей главе* приводятся непосредственные результаты работы. Софья Семеновна провела биоинформатический анализ, показав, что WBSCR27 скорее всего является метилтрансферазой, что в дальнейшем подтвердилось способностью белка прочно связывать кофактор метилирования SAM и его производное SAH. Используя набор методов молекулярной биологии и биохимии автор проверил наиболее очевидные потенциальные субстраты метилирования, ни один из которых не оказался истинным субстратом WBSCR27. Несмотря на то, что результат этой части работы отрицательный, полученные данные несомненно являются

ценными, поскольку, позволяют исключить большую часть наиболее распространенных вариантов и сфокусироваться на ограниченном наборе субстратов, более сложных для изучения. Наконец, Марьясина С.С. исследовала структуру и динамику WBSCR27, а также его способность связывать ряд лигандов методами ЯМР-спектроскопии. Эта часть работы является наиболее важной. Автору удалось получить структуру и характеристики внутримолекулярной подвижности для WBSCR27 в комплексе с SAH, а также в апо форме, выявить изменения в конформации белка, вызванные связыванием лиганда. Было показано, что WBSCR27 способен связывать и другие структурно близкие лиганды, а также обладает нуклеозидазной активностью.

В четвертой главе автор осмысляет полученные результаты, проводит сравнение полученной структуры со структурами других метилтрансфераз, рассуждает о потенциальных субстратах объекта исследования.

В конце диссертации приведено *заключение, выводы*, а также *список литературы*.

К работе нет замечаний принципиального характера, которые могли бы повлиять на общую оценку качества полученных результатов и достоверности выводов. Тем не менее можно сформулировать ряд вопросов и замечаний:

Замечания к оформлению работы:

1. На стр. 20 встречается понятие SET-домен, которое не расшифровывается и никак не поясняется в тексте.
2. Схема реакции на стр. 52 не имеет подписи и не пронумерована.
3. стр. 70 "*по **непрямому** спин-спиновому взаимодействию*" - что имеется в виду и зачем нужно такое уточнение?
4. Для понимания таблицы 11 недостает изображения структуры SAH с указанием нумерации атомов.

5. В подписи к рисунку 66 не указано, что обозначает окрашивание на панели D. Также, лучше было бы привести схему структуры в той же ориентации, что и на панелях В и С.
6. В Результатах работы недостает рисунка с детальным изображением взаимодействий, стабилизирующих молекулу лиганда в кармане связывания WBSCR27

Вопросы и замечания по сути работы:

1. В работе упоминается, что низкая стабильность образцов связана с окислительно-восстановительными процессами, для подавления которых в образец добавляли DTT. Рассматривалось ли использование другого восстановителя, TCEP? По сравнению с DTT последний имеет гораздо большее время жизни и окислительно-восстановительный потенциал.
2. По какой причине, для предсказания величин двугранных углов использовалось программное обеспечение TALOS+, а не TALOS-N?
3. *"Парный RMSD координат тяжёлых атомов метионинового фрагмента SAH в конечном семействе структур составляет $2,3 \pm 0,5$ Å. Для аденозинового фрагмента SAH это значение составляет $2,0 \pm 0,6$ Å. Такая разница может быть связана с большей подвижностью первых трёх α -спиралей относительно ядра белка."*
(стр. 114) - насколько это различие статистически достоверно, чтобы проводить подобное обсуждение?
4. Предпринимались ли попытки кристаллизации белка для структурных исследований?
5. Комплекс WBSCR27/SAM со временем превращается в комплекс WBSCR27/SAH (рис. 55). Может ли это означать, что в пробирке происходит реакция метилирования? Исключена ли возможность того, что субстратом метилирования является непосредственно сам белок WBSCR27?

Высказанные замечания не затрагивают основных положений и выводов, не снижают ценности и высокого качества представленной диссертационной работы не умаляют значимости диссертационного исследования. В целом, диссертация оставляет впечатление законченного исследования, сопряженного со значительным объемом экспериментальной работы. Диссертация написана хорошим литературным языком, качественно иллюстрирована, содержание работы в полной мере отражено в автореферате. Результаты исследования опубликованы в трех статьях в международных рецензируемых изданиях, во всех трех работах Софья Семеновна выступает в качестве первого автора, что подчеркивает ее основополагающий вклад в работу. Обоснованность выводов не вызывает сомнений. На основании изложенного выше считаю, что диссертационная работа Марьясиной Софьи Семеновны на тему **«Структура и функции белка WBSCR27, ассоциированного с синдромом Вильямса»** 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, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Марьясина Софья Семеновна 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:

д.х.н., заведующий лабораторией
биомолекулярной ЯМР
спектроскопии

Федерального государственное
бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской
академии наук

Минеев Константин Сергеевич

" " августа 2022

Контактные данные:

тел. +7(495)330-59-29, e-mail: mineev@nmr.ru

Специальность, по которой защищена диссертация оппонентом:

«Биоорганическая Химия», 02.00.10

Адрес места работы:

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

тел. +7(495)330-59-29, e-mail: mineev@nmr.ru