

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»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Установление детальных молекулярных механизмов лежащих в основе генетических заболеваний является важнейшим этапом поиска и разработки новых методов для их лечения. Синдром Вильямса - тяжелое генетическое заболевания, вызываемое делецией участков хромосомы и потерей нескольких десятков генов, одним из которых является ген, кодирующий белок WBSCR27. До начала диссертационных исследований Марьясиной С. С. имелась лишь информация о первичной последовательности WBSCR27, согласно которой данный белок мог относиться к семейству SAM-зависимых метилтрансфераз. Гомология по аминокислотной последовательности с бактериальными белками из *Thermotoga maritima* и *Bacillus thuringiensis*, для которых имеется структурная информация, составляла менее 30%. Поэтому работа по установлению роли, структуры и функции белка WBSCR27 методами биохимии и молекулярной биологии безусловно является актуальной задачей для фармакологии и медицины, результаты которой могут быть использованы для более глубокого понимания механизмов протекания синдрома Вильямса.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые автором методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения определена пространственная структура и динамические свойства белка в WBSCR27 апо-форме и в комплексе с ко-продуктом метилирования S-

аденозил-L-гомоцистеином (SAH); выполнен поиск субстратов метилтрансферазной активности белка и определены биохимические свойства белка WBSCR27, а также установлены механизмы взаимодействия белка с рядом низкомолекулярных веществ: SAM, S-аденозил-L-гомоцистеином (SAH), метилтиоаденозином (MTA), 5'-дезоксаденозином (5'dAdo) и аденином.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Результаты, полученные в диссертационной работе Марьясиной С. С. позволили на молекулярном уровне понять механизмы действия белка WBSCR27, ассоциированного с синдромом Вильямса. На основе анализа нуклеозидазной активности WBSCR27 было обнаружено, что фермент катализирует отщепление аденинового фрагмента от SAH, MTA и 5'dAdo, подобно действию бактериальных SAH/MTA-нуклеозидаз. Таким образом полученные результаты открывают возможности для поиска потенциальных субстратах метилирования WBSCR27 и установлению роли данного белка в проявлениях патологий при синдроме Вильямса.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Диссертационная работа Марьясиной С. С. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка сокращений и списка использованной литературы. Работа изложена на 141 страницах машинописного текста. Включает 73 рисунка и 13 таблиц. Список цитируемой литературы включает 184 источника на русском и английском языках.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ

Во **Введении** обосновывается выбор темы и объектов исследования, сформулирована актуальность и научная значимость, формулируются цель и

задачи исследования, результаты и положения, выносимые на защиту, их научная новизна, перечислены методы исследования, данные об апробации результатов, отмечен личный вклад автора.

В **Главе 1**, являющейся обзором литературы, изложены основы протекания реакции метилирования у различных организмов, приведено описание кофакторов и копродуктов реакции метилирования, описаны различия метилтрансфераз модифицирующих ДНК, РНК, белки и малые молекулы. Показано как нарушение функционирования метилтрансфераз может приводить к различным тяжелым заболеваниям и возможности применения метилтрансфераз в медицине не только как мишеней для лекарственных препаратов, но и как биомаркеров и факторов резистентности к антибиотикам. Также в данной главе описаны причины возникновения синдрома Вильямса и роль белка WBSCR27 в развитии данного заболевания, а также методы изучения метилтрансфераз. В целом обзор современной литературы демонстрирует уровень сложности материала, с которым столкнулся автор. Текст главы сопровождается большим количеством ссылок (135 в первой главе) и качественных иллюстраций, что дает достаточное представление о существующих на данный момент методах изучения метилтрансфераз, особенностях их строения и применения.

В **Главе 2** детально описаны экспериментальные подходы, которые использовались для решения поставленных задач. Согласно представленным данным, можно сделать вывод о широком и современном наборе методов, применяемым автором, что также свидетельствует о высоком профессиональном уровне исследователя. Особо стоит отметить мультидисциплинарность и разнообразность в применении экспериментальных подходов: генетических, биохимических, молекулярно-биологических, биофизических. Подача материала выполнена лаконично и доступно для специалистов из разных областей, но при этом описание всех методик дано таким образом, что возможно их воспроизведение или использование в качестве лабораторного протокола.

В третьей главе приведены основные результаты исследования структуры и функций белка WBSCR27. Детально описан весь путь исследований начиная от анализа аминокислотной последовательности, поиска субстрата метилирования и партнеров белка WBSCR27 в клетках эукариот до препаративного выделения меченного по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ белка и структурно-динамических исследований методом спектроскопии ЯМР белка в апо-форме и в комплексе с комплексом с ко-продуктом метилирования и рядом низкомолекулярных веществ.

В Главе 4 автором приведено обобщение полученных результатов работы. Выводы и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Результаты диссертационной работы апробированы на международных и всероссийских конференциях, опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web Of Science и Scopus.

К работе нет вопросов принципиального характера, которые бы повлияли на общую высокую оценку уровня проведенных исследований и достоверности полученных результатов, однако есть несколько замечаний:

1. В разделе 2.15.3 «Ориентация NH-связей» не указано по какой причине не были получены остаточные константы диполь-дипольного взаимодействия для апо-формы белка WBSCR27 в бицеллах DMPC/DHPC (Таблица 7).
2. В разделе 2.15.5 «Расчет структур» сказано, что часть ограничений на расстояния с нарушениями ограничений были либо исправлены, либо исключены. Сколько было таких исключенных ограничений на расстояния и по какой причине они могли наблюдаться в спектрах?
3. В разделе «3.2.6 WBSCR27 не распознает фрагменты потенциальных субстратов» при исследовании взаимодействия малых молекул с ^{15}N -меченым комплексом WBSCR27/SAM методами гетероядерной спектроскопии ЯМР на основе отсутствия изменений химических сдвигов ^1H и/или ^{15}N амидных групп белка WBSCR27

сделан вывод об отсутствии специфического узнавания данных фрагментов белком. Однако не сказано наблюдались ли изменения во временах корреляции остатков белка и анализировалось ли комплексообразование методами диффузионно-упорядоченной спектроскопии DOSY?

4. В таблице 9 значения величин расстояний в Å и углов в градусах приведены с точностью до 10^{-4} . Как достигалась данная точность и как рассчитывались погрешности? В то же время в таблицах 12 и 13 напротив не приведены диапазоны погрешностей определяемых величин.
5. В тексте встречаются англицизмы и стилистические ошибки: «частота сэмпирования», «прикапыванием концентрированной кислоты» и т.п.

Высказанные замечания не затрагивают основных положений, защищаемых автором, и не снижают ценности проведенного исследования и высокого качества представленной диссертационной работы. Диссертация производит впечатление законченного исследования, основанного на объемной и тщательно выполненной экспериментальной и теоретической работе. Автореферат полностью и точно отражает содержание диссертации. Диссертация 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:

доктор физико-математических наук,
заведующий лабораторией структурного
анализа биомакромолекул
ФГБУН «Федеральный
исследовательский центр «Казанский
научный центр Российской академии
наук»

Усачев Константин Сергеевич

5.09.2022

Контактные данные:

тел.: 7(843)2927597, e-mail: k.usachev@knc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.02 – Биофизика

Адрес места работы:

420111, Российская Федерация, Татарстан, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр
Российской академии наук», лаборатория структурного анализа
биомакромолекул
Тел.: 7(843)2927597; e-mail: k.usachev@knc.ru