

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Монаховой Майи Викторовны
на тему: «Белки MutS и MutL: межмолекулярные взаимодействия на
начальных этапах репарации «мисматчей» в ДНК»
по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (химические науки)**

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Монаховой М.В. посвящена изучению взаимодействия с ДНК белков MutS и MutL, входящих в систему репарации неканонических пар оснований в ДНК (MMR). Системы репарации ДНК играют ключевую роль в поддержании целостности генома, предотвращая возникновение мутаций и связанных с ними заболеваний. Дефекты в работе систем репарации ДНК, в том числе MMR, приводят к появлению мутаций и, в конечном счете, к возникновению онкологических заболеваний. Несмотря на интенсивные исследования механизма функционирования системы MMR у различных организмов, включая человека, многие детали этого процесса остаются не известными. В частности, много нерешенных вопросов касается строения комплекса MutS-MutL-ДНК на начальном этапе процесса MMR. Таким образом, изучение закономерностей формирования комплексов белков, функционирующих на начальных этапах MMR, с ДНК, с использованием реакционноспособных ДНК-дуплексов, проведенное в диссертационной работе Монаховой М.В., является актуальным.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Монаховой М.В. включает все необходимые разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, а также их обсуждение, выводы и список используемой литературы, содержащий 287 источников. Диссертация изложена на 168 страницах, иллюстрирована 67 рисунками и содержит 13 таблиц.

Во вводной части автор обосновывает актуальность темы исследования, определяет нерешенные вопросы на момент начала работы, формулирует цель, задачи и методологию своей работы, ее новизну, научную и практическую значимость полученных результатов, выносимые на защиту положения. В конце вводной части приведены сведения о личном вкладе автора в исследование, а также о представлении результатов на международных и российских конференциях и их публикации.

Обзор литературы непосредственно связан с содержанием экспериментальной части работы и полученными результатами. В обзоре обсуждаются известные в настоящее время данные о механизме функционирования системы MMR, общих чертах и особенностях протекания процесса в различных организмах. Рассмотрены предполагаемые модели активации процесса – наиболее сложного вопроса в функционировании этой системы репарации, отличительной особенностью которой является значительная удаленность места гидролиза дочерней цепи ДНК от «мисматча». Подробно описаны строение и функции исследуемых в работе белков – MutS и MutL, их взаимодействие с ДНК и другими белками. Обзор иллюстрирован большим количеством структурных данных, полученных из литературных источников. В заключении к обзору литературы автор обосновывает выбор темы исследования и определяет цель своей работы.

Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением методов биоорганической химии, биохимии и биоинформатики, которые подробно описаны в соответствующей главе диссертации. Широкий набор и разнообразие использованных в работе методов и подходов позволили автору получить интересные и значимые результаты.

Результаты работы и их обсуждение представлены в соответствии с логикой исследования. Глава начинается с характеристики

модифицированных реакционноспособных ДНК, использованных в работе в качестве аффинных реагентов. Далее подробно охарактеризованы исследуемые белки, особое внимание автор уделит возникшим при получении белка MutL из *R. sphaeroides* проблемам и их решению. Проведен анализ свойств этого белка, впервые полученного в данной работе, в сравнении с ранее охарактеризованным белком из *N. gonorrhoeae*. Проведенные исследования продемонстрировали значительное структурное и функциональное сходство белков MutL из двух различных микроорганизмов.

Большая часть работы посвящена подробному анализу взаимодействия белков MutS и MutL с ДНК с применением метода аффинной модификации. В этой части работы получены наиболее яркие и биологически значимые результаты. В работе впервые использованы дикарбонильные производные олигонуклеотидов для модификации остатков аргинина в исследуемых белках. Продемонстрировано, что белки MutS и MutL системы MMR *E. coli* (ecMutS и ecMutL) эффективно образуют конъюгаты с ДНК-дуплексами, содержащими остаток 2'-дезоксид-2'-(4,6-диоксогептиламидо)уридина. Показана эффективность и специфичность ДНК-дуплексов, содержащих акриламидную группу при С5-атоме дезоксиуридина, в качестве аффинных реагентов для модификации остатков цистеина мутантных форм белка MutS из *E. coli*. С помощью этих ДНК-реагентов автору удалось зафиксировать новое, ранее не описанное конформационное состояние MutS в комплексе с ДНК-дуплексом, в котором некоплементарная пара G/T находится на расстоянии 2 пар нуклеотидов от 3'-конца дуплекса. Методом аффинной модификации в сочетании с методом флуоресцентного резонансного переноса энергии впервые показано, что ковалентно присоединенный к ДНК белок ecMutS сохраняет свою активность и способен взаимодействовать с ecMutL.

В заключении автор суммирует полученные результаты, обозначает их научную значимость и возможности дальнейшего использования, а также направления развития исследований.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность полученных соискателем результатов не вызывает сомнений. Выводы обоснованы и полностью вытекают из представленных в диссертации данных. Автореферат диссертации отражает основные результаты исследования и соответствует содержанию диссертации. По результатам работы опубликованы 7 статей в различных российских и международных изданиях, что значительно превышает необходимое число публикаций для защиты кандидатской диссертации. Результаты исследования были многократно представлены на международных и всероссийских научных конференциях.

Замечания

Работа не содержит принципиальных недостатков. Тем не менее, ряд замечаний, касающихся содержания диссертации и представления результатов, можно сделать.

1. Обзор литературы написан подробно и логично. Но по каким-то причинам он никак не озаглавлен. Помимо этого, есть несоответствие в названии главы II.3. и ее содержании. В главе, озаглавленной «Белки MutS и MutL как ключевые участники процесса репарации «мисматчей» в ДНК», описаны только структура и функции белка MutS, тогда как белку MutL посвящена отдельная глава II.4. «Строение белков MutL и их функции».

2. Основной метод исследования, используемый в работе, – аффинная модификация. В тексте автор также использует термины «кросслинкинг», «ковалентное связывание» и «сшивание». То же относится к продукту аффинной модификации – это и «ковалентный комплекс», и «сшитый комплекс», и «конъюгат». Все

эти термины используются хаотично, что несколько отвлекает от содержания текста.

3. Большие усилия были затрачены автором на получение препарата белка MutL из *R. sphaeroides*. Однако исследования этого белка ограничились анализом его свойств в сравнении с белком-гомологом из *N. gonorrhoeae*. Несмотря на структурное и функциональное сходство двух белков, MutL из *R. sphaeroides* по каким-то причинам не связывал использованные в работе ДНК. Автор ограничивается простой констатацией этого факта: «В выбранных условиях нам не удалось зафиксировать комплексообразование rsMutL с ДНК», – никак не обсуждая возможные причины различия ДНК-связывающих свойств этих белков. Хотелось бы услышать предположения автора о причинах отсутствия ДНК-связывающей активности rsMutL в рамках выполненных экспериментов.

Вместе с тем, указанные замечания носят в большей степени технический и дискуссионный характер и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Монахова Майя Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (химические науки).

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,
Ведущий научный сотрудник лаборатории биоорганической химии
ферментов
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО
РАН

Речкунова Надежда Ивановна

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
1.5.4 – биохимия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

Подпись Речкуновой Н.И. удостоверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН
К.б.н.

Логашенко Евгения Борисовна