

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 избранной темы

За устранение повреждений ДНК, возникающих в результате внешних и внутренних факторов, ответственна одна из систем репарации ДНК – система репарации неканонических пар нуклеотидов (MMR). В систему MMR входят более десяти белков, включая белки MutS и MutL, которые обеспечивают узнавание G/T-«мисматчей» ДНК. Подобные повреждения ДНК могут приводить к апоптозу и возникновению онкологических заболеваний. Однако понимание механизмов функционирования системы репарации MMR затруднено из-за сложности системы и ограниченности подходов, необходимых для ее изучения. Таким образом, диссертационная работа Монаховой М.В. вносит существенный вклад в изучение системы репарации повреждений ДНК – MMR, и разработку подходов для изучения ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий.

Научная новизна исследования. В работе впервые использованы три новых типа реакционных групп в ДНК для изучения аффинной модификации ферментов репарации «мисматчей» MutS и MutL. Впервые получены белки MutL с эндонуклеазной активностью из бактерий *Neisseria gonorrhoeae* и *Rhodobacter sphaeroides* и их свойства и взаимодействие с ДНК и АТФазная активность охарактеризованы. Впервые предложен подход для изучения быстрой кинетики конформационных переходов ДНК в комплексе с есMutS и кинетики формирования тройного комплекса ДНК-есMutS-есMutL.

Структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Работа изложена на 168 страницах, включая страницы со списком цитированной литературы. Также она включает 67 рисунков и 13 таблиц. Диссертация содержит следующие стандартные разделы: «Оглавление», «Список использованных сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы».

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности проблемы, сформулированы цели и задачи работы, обозначены объект и предмет исследования, научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость работы, методология диссертационного исследования, личный вклад автора, положения, выносимые на защиту, апробация работы, публикации и структура и объем диссертации.

«Обзор литературы» включает данные о современном состоянии исследований в области изучения репарации ДНК с акцентом на систему репарации «мисматчей» в ДНК. Даются общие представления о системе MMR и ее роли при различных заболеваниях человека. Описаны системы репарации MMR в различных организмах, в том числе не содержащих эндонуклеазу MutH. Описаны мобильные и стационарные модели активации системы MMR. Даются представления о структурной организации и функциях ключевых участников репарации «мисматчей» ДНК, таких белков как MutS и MutL.

В целом, «Обзор литературы» написан ясно, хорошим научным языком, широко охватывает материал и дает полное представление о проблемах и задачах в данной области исследования.

Глава «Материалы и методы» подробно описывает стандартные процедуры, использованные при проведении исследований. Автор

демонстрирует использование большого арсенала современных методов молекулярной и клеточной биологии, таких как: синтез модифицированных олигонуклеотидов и их очистка с помощью хроматографии, стандартное молекулярное клонирование, выделение и очистка белков из бактериальных культур, торможение белковых комплексов в геле, аффинная модификация белков. Кроме того, стоит отметить использование автором сложного метода детекции FRET сигнала для определения быстрой кинетики ДНК-белковых взаимодействий с помощью метода остановленного потока. Методический уровень диссертации, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из 7-ми частей и содержит основные результаты работы. На первом этапе работы были проведены клонирование, выделение и очистка мутантных форм белков MutS и MutL из различных бактерий (ecMutS, ecMutL, ngMutL и rsMutL) согласно анализу данных литературы, данных рентгеноструктурного и выравниванию аминокислотных последовательностей белков.

На следующем этапе работы проведено изучение эндонуклеазной, АТФазной и ДНК-связывающей активностей бактериальных белков с эндонуклеазной функцией - rsMutL и ngMutL - в присутствии различных ионов металлов, АТФ и других кофакторов.

Затем был проведен синтез и очистка ДНК-субстратов, содержащих бета-дикетогруппу в углеводном фрагменте ДНК. Полученные ДНК-субстраты были использованы для аффинной модификации белков ecMutS и ecMutL по остаткам аргинина и лизина.

Далее были синтезированы и очищены ДНК субстраты, содержащие пиридилдисульфидную группу в гетероциклическом основании. Полученные модифицированные ДНК были использованы для зондирования контактов в ДНК-связывающем центре N-концевого домена ecMutL, в том числе в присутствии ecMutS, и для аффинной модификации ngMutL в присутствии кофакторов.

Затем была изучена модификация мутантных форм есMutS с остатками цистеина в позициях 497 и 336 с помощью пиридилдисульфидной группы в присутствии нуклеотидных кофакторов.

На предпоследнем этапе работы был разработан подход по получению в препаративных количествах и очистке конъюгатов есMutS с ДНК, содержащей пиридилдисульфидную группу. С помощью полученных конъюгатов, содержащих FRET-пары флуоресцентных меток были изучены конформационные переходы ДНК в комплексе с есMutS и кинетика этих переходов. Также с помощью конъюгатов есMutS-ДНК и метода FRET была показана возможность формирования комплекса с флуоресцентно-меченным есMutL и изучена кинетика формирования тройного комплекса.

И, наконец, на последнем этапе работы Монахова М.В. с помощью полученных ДНК, содержащих акриламидную группу, изучила особенности аффинной модификации мутантных форм есMutS.

Текст сопровождается 287-ю ссылками, большая часть которых относится к работам последних двух десятилетий, в том числе 2022 года.

Диссертационная работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». Все научные положения, выносимые на защиту, заключения и научные выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации достоверны, обоснованы, новы и полностью отражают полученные научные результаты.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертационная работа отражена в семи научных статьях, опубликованных автором в зарубежных и отечественных журналах *Molecules* (MDPI), *Молекулярная биология*, *Биоорганическая химия*, *Biochimie*, *Биохимия* и *Journal of Chromatography*. Результаты исследования доложены на 18-ти всероссийских и международных конференциях.

В целом, работа выполнена на самом высоком научном уровне, существенных замечаний к представленной работе нет:

Отмечу, что в диссертации хотя и присутствуют опечатки и орфографические ошибки, но они не относятся к научной сути работы, и замечу, что их гораздо меньше, чем в других работах, которые я оппонировал.

Замечание к работе:

Так как в работе используются мутантные формы белка MutS, то важно понимать, насколько меняются их свойства после замены аминокислот и в какой степени полученные данные соотносятся с данными для белка дикого типа без мутаций.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным требованиям

Вместе с тем, указанное замечание не умаляет значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа Монаховой Майи Викторовны на тему: «Белки MutS и MutL: межмолекулярные взаимодействия на начальных этапах репарации «мисматчей» в ДНК» 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 (по химическим наукам).

Официальный оппонент:

кандидат химических наук,
старший научный сотрудник лаборатории молекулярного конструирования
Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный
исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский
институт»)

Субач Федор Васильевич

/Ф.В. Субач/

17 ноября 2023 г.

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.10 – биоорганическая химия

Адрес места работы:

123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный
исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский
институт»), лаборатория молекулярного конструирования

Подпись сотрудника

НИЦ Курчатовский институт Ф.В. Субача удостоверяю:

Главный Ученый секретарь Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

к.ф.-м.н. Борисов К.Е.

17 ноября 2023