

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации

Старковой Татьяны Юрьевны на тему: “ Структурно-функциональные особенности «линкерных» белков хроматина HMGB1 И H1”, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Естественным носителем генетической информации в эукариотической клетке является хроматин - нуклеопротеиновый комплекс, состоящий из ДНК, гистонов и негистоновых белков. Именно в составе хроматина происходит реализация генетической информации, а также репликация, репарация и рекомбинация ДНК. При этом хроматин, является не просто пассивным «упаковщиком» ДНК, но и важнейшим регулятором генетических процессов. Хроматин является одним из основных носителей эпигенетической информации. Эпигенетическое регулирование отвечает за множество процессов в клетке, включая один из важнейших - клеточную дифференциацию. Нарушения эпигенетических регуляций приводят к развитию многочисленных заболеваний, в том числе раковых. На уровне структуры хроматина генетическое регулирование реализуется через внесение ковалентных модификаций в гистоновые белки, ремоделирование хроматина, включение вариантных гистонов, изменение трехмерной архитектуры хроматина и включение в состав хроматина негистоновых белков, а также их модификацию. Структурная организация и функционирование хроматина определяется взаимодействием между его структурными элементами: ДНК и белками. Таким образом, изучение регуляции ДНК-белкового и белок-белкового взаимодействия компонентов хроматина является одной из наиболее актуальных проблем современной молекулярной биологии. В связи с этим можно сделать вывод, что работа Т.Ю. Старковой безусловно актуальна и заслуживает внимания.

Диссертационная работа Т.Ю. Старковой посвящена изучению механизмов взаимодействия негистонового хромосомного белка HMGB1 с ДНК и взаимодействующими с ним белками, в частности гистоном H1.

Диссертация Т.Ю. Старковой изложена на 125 страницах и построена традиционно, состоит из оглавления, введения, обзора литературы (Глава 1), главы материалы и методы (Глава 2), главы результаты и обсуждение (Глава 3), заключения, выводов и списка литературы. Список цитируемой литературы содержит 204 наименования работ отечественных и зарубежных авторов.

В обзоре литературы рассматриваются основные работы посвященные различным уровням организации хроматина, структуре линкерного гистона H1 и его взаимодействию с ДНК, а также структуре, функциям и взаимодействию с ДНК негистонового хромосомного белка HMGB1. Автор детально рассматривает как первый – нуклеосомный уровень организации хроматина и структурную организацию гистоновых белков, так и имеющиеся в литературе данные о более высоких уровнях организации и упаковки хроматина. Поскольку одной из задач работы являлось исследование посттрансляционных модификаций линкерного гистона H1, особое внимание в обзоре литературы уделено анализу данных о структуре и механизмах взаимодействия с ДНК этого гистона. Наконец, тщательно рассмотрены имеющиеся в мировой литературе сведения о негистоновом белке хроматина HMGB1. Во всех разделах литературного обзора особое внимание уделяется особенностям структурной организации белков, а также их ковалентной модификации, как основы для понимания механизмов взаимодействия этих белков друг с другом и ДНК, определяющих их функционирование в клетке. В целом создается впечатление, что автор хорошо знаком с состоянием изучаемой проблемы и легко ориентируется в наиболее перспективных направлениях ее развития.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит подробное описание молекулярно-биологических, биохимических и физико-химических методов, использованных автором работы. Автором использованы такие самые современные методы физико – химического анализа как МАЛДИ масс-спектрометрия и спектроскопия кругового дихроизма, а также метод двумерного электрофореза белков. Они современны, надёжны и позволили получить оригинальные результаты. Автор диссертации детально описывает и давно ставшие рутинными методы выделения плазмид и электрофореза ДНК. В целом, все использованные методы являются абсолютно адекватными для решения поставленных автором диссертации задач.

В разделе «Результаты и обсуждение» Т.Ю. Старкова рассматривает результаты собственных исследований структурных характеристик белка HMGB1 в свободном состоянии и в комплексах с ДНК и с гистоном H1, а также проведенного ею анализа посттрансляционных модификаций белков хроматина HMGB1, HMGB2 и линкерного гистона H1.

Используя метод кругового дихроизма автор проследила за изменениями вторичной структуры полноразмерной молекулы HMGB1 в свободном состоянии и при взаимодействии с плазмидной ДНК и высокомолекулярной ДНК из тимуса теленка. Автором диссертации впервые показано, что HMGB1 способен изменять свою структуру в зависимости от мишени связывания: в процессе взаимодействия HMGB1 с

высокомолекулярной ДНК тимуса теленка происходит увеличение на 20 % содержания аминокислотных остатков, находящихся в α -спиральной конформации, в то время как связывание HMGB1 с плазмидной ДНК pUC19 проходит без изменений вторичной структуры белка. Возникает вопрос – с чем автор связывает существование таких различий? Несмотря на то, что данный раздел работы носит название «Результаты и обсуждение», этот результат, являющийся также первым выводом работы, практически не обсуждается.

Согласно одной из моделей функционирования HMGB1 как фактора, оказывающего влияние на доступность участков ДНК, происходит взаимодействие белка HMGB1 с H1, приводящее к высвобождению линкерного гистона H1. Автором показано, что взаимодействие белка HMGB1 с гистоном H1 приводит к изменениям вторичной структуры как минимум одного из белков.

Большой массив данных был получен автором при изучении посттрансляционных модификаций подтипов H1.0, H1.1, H1.2, H1.3 и H1.4 линкерного гистона H1. Изучению посттрансляционных модификаций коровых гистонов и их функциональной значимости посвящена огромная литература, внесение таких модификаций считается основой «гистонового кода». В то же время, о модификациях гистона H1 и их биологической значимости известно намного меньше. С помощью двумерного электрофореза и масс-спектропии автором детально охарактеризован спектр посттрансляционных модификаций гистона H1. Большинство найденных в работе посттрансляционных модификаций подтипов гистона H1 выявлено впервые. При чтении этого раздела у меня возникло следующее замечание. Автор пишет: «Глобулярный домен подтипов H1.1, H1.2, H1.3 и H1.4 гистона H1 характеризуется наличием нескольких сайтов метилирования, что может приводить к увеличению положительного заряда полипептидной цепи в областях модификаций и, как следствие, увеличения силы его взаимодействия с ДНК.». Метильные группы являются электрически нейтральными и их внесение не должно изменять заряд белка.

В последней части этого раздела диссертации автор провел сравнительный анализ ковалентных модификаций в негистоновых белках хроматина HMGB1 и HMGB2. В диссертационной работе впервые выявлены сайты посттрансляционных модификаций белка HMGB1: AcK50, AcK59, AcK65, AcK68, AcK81, AcK86-88, AcK90, AcK162, MetR70 или MetR73, MetK76, MetK154, MetK157, MetK167, MetK171; сайты фосфорилирования в положениях PT51 или PS53, PT77 или PY78, PY155. Подтверждено наличие сайта ацетилирования HMGB1 в положении K81, оказывающего влияние на пространственную укладку белковой молекулы. Впервые показано, что положение посттрансляционных

модификаций белков HMGB1 и HMGB2 различно. Большая часть найденных в белках модификаций идентичны, в то время как модификации AsK57, AsK76, AsK85, AsK152, AsK154, MetK82, PY78 характерны только для белка HMGB2. Надо отметить, что аналогичный вопрос о роли метилирования в изменении заряда белка относится и к анализу данных в этой части работы. Анализ расположения модификаций аминокислотной последовательности В-домена белков показал, что большинство сайтов метилирования находятся в области связывания HMGB1 и HMGB2 с рецептором конечных продуктов гликозилирования (RAGE), что ограничивает доступ RAGE к сайту связывания белка HMGB1. Данный вывод существенен для понимания механизмов функционирования этих белков.

В целом данный раздел диссертации показывает хорошую профессиональную подготовку Т.Ю. Старковой, её умение проводить исследования, используя биохимические, молекулярно-биологические и биофизические методы, дать содержательный анализ полученных данных, оценить их новизну и практическое значение.

Прочтение диссертации принципиальных замечаний не вызывает. Диссертация написана хорошим русским языком и практически не содержит обычных в таких работах опечаток. Встречаются только отдельные пропущенные в предложениях слова и неправильное согласование слов в некоторых предложениях, например на стр. 65 и 97, в подписи к рисунку 34 белок HMGB1 назван «негистоновым гистоном». Тем не менее, отмеченные мною замечания не затрагивают существа работы и не изменяют ее высокой научной значимости.

Рецензируемая работа представляет собой законченное исследование. Результаты исследования могут найти применение при чтении соответствующих спецкурсов.

В целом, задачи рецензируемой работы хорошо обоснованы, использованные методы отвечают поставленным задачам, а выводы согласуются с содержанием работы. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Диссертация “ Структурно-функциональные особенности «линкерных» белков хроматина HMGB1 И H1” представляет собой завершенное исследование в рамках поставленных задач. Полученные данные представляют интерес для специалистов молекулярных биологов, биофизиков, биохимиков и цитологов и могут быть использованы в соответствующих учреждениях РАН, кафедрах молекулярной биологии, биофизики и биохимии университетов, что позволяет сделать вывод о том, что диссертационная работа Старковой Т.Ю.. соответствует требованиям, указанным в Положении о присуждении ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24

сентября 2013 г. 2013 №842). Представленная диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей большое значение для развития молекулярной биологии, а ее автор Старкова Татьяна Юрьевна безусловно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Старший научный сотрудник
Отделения молекулярной и радиационной биофизики
Петербургского института ядерной физики

НИЦ «Курчатовский институт»,
кандидат биологических наук

Конев Александр Юрьевич.

Петербургский институт ядерной физики НИЦ КИ
Ленинградская область г. Гатчина, Орлова роща

<http://www.pnpi.spb.ru/>

Тел. 813-71-462-64, konev.alexander@gmail.com

26.05.2015 г.

Подпись руки

Конев А. Ю.



отдел кадров

Старкова О.К.