

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу Старковой
Татьяны Юрьевны " СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
ОСОБЕННОСТИ
«ЛИНКЕРНЫХ» БЕЛКОВ ХРОМАТИНА HMGB1 И H1", представленную
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Актуальность темы

Актуальность работы Т.Ю. Старковой определяется самой темой исследования, а именно, изучением роли организации хроматина - высоко динамичного ДНК-белкового комплекса в регуляции транскрипции и трансляции. В частности работа посвящена исследованию механизмов взаимодействия негистонового хромосомного белка HMGB1 с ДНК и взаимодействующими с ним белковыми молекулами, в частности гистоном H1. Это направление далеко не достаточно изучено в настоящее время. Особенно важным представляется изученное в данной работе влияние матрицы ДНК на конформацию изучаемых белков, при этом детальные механизмы взаимодействия «линкерных» белков HMGB1 и H1 с ДНК и между собой до конца не изучены.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций.

Автор корректно использует самые современные известные научные методы обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций. В соответствии с поставленной целью по анализу структурных характеристик белка HMGB1 в свободном состоянии и в составе комплексов с ДНК и с гистоном H1, выявление пост-трансляционных модификаций «линкерных» белков хроматина HMGB1, HMGB2 и гистона H1 автор ставит несколько соответствующих задач. Это анализ вторичной структуры полноразмерного природного белка HMGB1, в том числе в свободном состоянии и при взаимодействии с ДНК и гистоном H1, влияние HMGB1 на структурные и термодинамические параметры ДНК при их взаимодействии и др. Использованный широкий спектр самых современных методов, подробно описанных в работе позволил вынести на защиту несколько вполне обоснованных положений, нашедших полное отражение в выводах работы: негистоновый хромосомный белок HMGB1 способен изменять свою вторичную структуру при связывании как с ДНК, так и с гистоном H1; посттрансляционные модификации негистоновых хромосомных белков HMGB1 и HMGB2 различны; большая часть найденных в белках модификаций идентичны, в то время как модификации AsK57,

AcK76, AcK85, AcK152, AcK154, MetK82, PY78 характерны только для белка HMGB2; среди посттрансляционных модификаций гистона H1 доминируют модификации положительно заряженных остатков лизина в различных положениях, что приводит к уменьшению положительного заряда полипептидной цепи белковых молекул и может оказывать влияние на связывание гистона H1 и HMGB1 между собой и с ДНК. Обоснованность и достоверность основных результатов и выводов работы обеспечивается, как уже упоминалось, использованием современного оборудования, отработанных методик выделения биологического материала, методов обработки и анализа данных, высокой во производимостью полученных результатов. Работа имеет, в первую очередь, теоретическое значение. Полученные данные существенны для понимания как роли негистонового хромосомного белка HMGB1 в структурной организации хроматина, так и его участия в регуляторных клеточных процессах. При этом, новые знания о структурных особенностях белка HMGB1 в комплексе с ДНК и с линкерным гистонном H1 могут быть полезны при создании фармакологических подходов при разработке новых терапевтических средств.

Оценка новизны, практического значения и достоверности

В работе ряд результатов был получен впервые. Так, в работе впервые показано, что HMGB1 способен изменять свою структуру в зависимости от мишени связывания, что показано в сравнении взаимодействия HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка и с плазмидной ДНК pUC19. В работе впервые выявлены сайты ряда посттрансляционных модификаций белка HMGB1 по метилированию и фосфорилированию нескольких аминокислот в положениях в различных положениях. Подтверждена известная роль наличия сайта ацетилирования HMGB1 в положении K81 во влиянии на пространственную укладку белковой молекулы. Впервые показано, что положение посттрансляционных модификаций белков HMGB1 и HMGB2 различно. Очень интересный результат касается того, что характер и расположение посттрансляционных модификаций белка HMGB1 и гистона H1 отличаются высокой межвидовой консервативностью, но варьирует внутри организма в зависимости от типа ткани. Как представляется, последний результат особенно важен для разработки новых фармакологических препаратов, в том числе и в связи с тем, что HMGB-доменные белки могут выступать как посредники при переносе в ядро клетки. Достоверность всех полученных впервые результатов не вызывает сомнения в связи с самым высоким уровнем методических приемов исследования и исчерпывающей статистической обработкой данных.

Оценка структуры и содержания диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 204 ссылки. Диссертация изложена на 125 страницах с 47 рисунками и 8 таблицами. Во введении автор справедливо обосновывает необходимость исследования тем, что детальны механизмы взаимодействия линкерных белков HMGB1 и H1 с ДНК и между собой до конца не изучены. Они могут включать как изменение заряда полипептидной цепи белковых молекул посредством посттрансляционных модификаций, так и изменение структуры HMGB1, HMGB2 и H1 при взаимодействии с ДНК и между собой. Литературный обзор написан на очень высоком уровне и совершенно логично посвящен рассмотрению структуры и функции хроматина в целом, а также белков H1, HMGB1, HMGB2, включая возможные механизмы взаимодействия с ДНК. К заслугам автора надо отнести и то, что обзор прекрасно иллюстрирован рисунками. Очень хорошо изложены материалы и методы исследования, позволяющие оценить достоверность полученных результатов. При этом методы разнообразны и современны и включают различные типы электрофореза, Малди (MALDI) масс-спектрометрию, спектроскопию кругового дихроизма, спектрофотометрическое плавление ДНК. Что очень ценно, автор при описании этих достаточно сложных методов включает и теоретическое их обоснование, не ограничиваясь только собственным описанием самого метода. Все это служит дополнительным обоснованием адекватности используемых методических подходов и достоверности результатов. Собственные результаты автора заслуживают самой высокой оценки с точки зрения их разнообразия и достоверности. Было проведено исследование вторичной структуры и термодинамической стабильности полноразмерного природного белка HMGB1 в свободном состоянии и при взаимодействии с ДНК. Изучены термостабильность ДНК в комплексе с HMGB1 и посттрансляционные модификации подтипов линкерного гистона H1. Представляют особый интерес данные по посттрансляционным модификациям негистоновых белков хроматина HMGB1 и HMGB2. То есть автор очень подробно иллюстрирует своими данными и их обсуждением закономерность и справедливость выдвинутых положений. Выводы полностью соответствуют полученным результатам и положениям автора.

Недостатки и общие замечания по диссертационной работе.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Основная цель достигнута. Задачи исследования решены, получены важные научные данные, выводы сформулированы четко и ясно в соответствии с поставленными задачами исследования и положениями, вынесенными на защиту. Имеется несколько замечаний, в основном, редакционного и дискуссионного характера.

1. На стр. 5. Задача : " Определить влияние HMGB1 на структурные и термодинамические параметры ДНК при взаимодействии". О каком взаимодействии идет речь
2. На стр. 29. " Так же было показано..." Видимо все-таки надо также писать вместе
3. На стр. 53 " Процесс денатурации и ренатурации молекулы ДНК в научной среде" звучит достаточно двусмысленно
4. Можно ли с помощью HMGB-домена различать одно- и двунитевые участки ДНК, например, при помощи гель-шифт анализа и использовать его для анализа АТ-специфических сайтов in situ
5. Заключение носит характер скорее краткого изложения результатов работы, то есть, почти предваряет выводы. Видимо в заключении надо было просто подчеркнуть значение полученных данных, тем более таких интересных.

Заключение

Диссертация Старковой Татьяны Юрьевны «Структурно-функциональные особенности линкерных белков хроматина HMGB1 и H1» является законченной самостоятельно выполненной научной квалификационной работой. По актуальности, поставленным целям и задачам, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, их научной и практической значимости, настоящая диссертационная работа полностью отвечает требованиям п.9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности "03.01.03 - молекулярная биология.", а ее автор Татьяна Юрьевна Старкова заслуживает присвоения искомой ученой степени.

Официальный оппонент –

Заведующий Лабораторией молекулярной

цитогенетики развития млекопитающих

Отдела молекулярной генетики

ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины",

доктор биологических наук, профессор Евгений Львович. Паткин

тел. (812)234-56-06

e-mail: elp44@mail.ru

20 мая 2015 г.

