



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

28.05.15 № 401/1-214.1-471

на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
академик



Иванов В.Т.

28 мая 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Старковой Татьяны Юрьевны "СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ «ЛИНКЕРНЫХ» БЕЛКОВ ХРОМАТИНА NMGB1 И H1", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Актуальность исследования

Диссертационная работа Т.Ю. Старковой имеет фундаментальную направленность и расширяет представление об особенностях взаимодействия негистонового хромосомного белка NMGB1 семейства NMG с ДНК и линкерным гистоном H1, что имеет важное значение для понимания механизмов структурно-функциональной организации хроматина на участке между нуклеосомами, и как следствие, механизмов регуляции экспрессии генов.

Новизна исследований и полученных результатов

Целью данной работы являлось анализ структурных характеристик белка NMGB1 в свободном состоянии и в составе комплексов с ДНК и с гистоном H1, выявление посттрансляционных модификаций «линкерных» белков хроматина NMGB1, NMGB2 и гистона H1. В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи: 1)

определить вторичную структуру полноразмерного природного белка HMGB1 в условиях эксперимента и охарактеризовать ее термодинамическую стабильность; 2) провести сравнительный анализ вторичной структуры белка HMGB1 в свободном состоянии и при взаимодействии с ДНК и гистоном H1; 3) определить влияние HMGB1 на структурные и термодинамические параметры ДНК при взаимодействии; 4) провести сравнительный анализ посттрансляционных модификаций негистоновых белков хроматина HMGB1 и HMGB2; 5) охарактеризовать посттрансляционные модификации подтипов линкерного гистона H1.

В работе ряд результатов получен впервые. На ДНК-белковых системах (высокомолекулярная ДНК тимуса теленка/HMGB1 и плазмидная ДНК pUC19/HMGB1) впервые показано, что HMGB1 способен изменять свою структуру в зависимости от мишени связывания. Впервые выявлены сайты ряда посттрансляционных модификаций белка HMGB1 по ацетилированию, метилированию и фосфорилированию в функционально-значимых участках полипептидной последовательности белка. Подтверждена биологическая роль наличия ацетилирования по лизину в положении K81 в аминокислотной последовательности белка о влиянии дополнительного отрицательного заряда на пространственную укладку белковой молекулы. Впервые показано, что положение посттрансляционных модификаций высоко гомологичных белков HMGB1 и HMGB2 различно. Большая часть найденных в белках модификаций идентичны, в то время как модификации AcK57, AcK76, AcK85, AcK152, AcK154, MetK82, PY78 характерны только для белка HMGB2.

Научно-практическая значимость работы

Научная новизна определяется фундаментальностью поставленных задач в области молекулярной биологии, развитием представлений о структурно-функциональной организации хроматина с возможностью использования полученных результатов при подготовке специалистов в области молекулярной биологии и биофизики.

Новые знания о структурных особенностях белка HMGB1 в комплексе с ДНК и с линкерным гистоном H1 могут быть полезны при создании фармакологических подходов при разработке новых терапевтических средств. Это связано с тем, что HMGB-доменные белки могут выступать как посредники при переносе в ядро клетки широко используемого в клинической практике противоопухолевого препарата цисплатина.

Оценка содержания диссертации

Диссертация (изложена на 125 стр.) имеет стандартную структуру и содержит следующие разделы: введение (5 стр.), обзор литературы (21 стр.), материалы и методы (23

стр.), результаты и обсуждение (41 стр.) и выводы, содержит 47 рисунков и 8 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 204 источника.

Название работы отражает тему и содержание исследования. В разделе «Введение» Т.Ю. Старкова вводит читателя в проблему, изучению которой посвящена работа, характеризует актуальность и цель работы, формулирует конкретные задачи исследования, описывает научную новизну и теоретическую значимость работы, обоснованность и достоверность полученных результатов.

Раздел «Обзор литературы» представлен 3-мя главами, в которых дана характеристика структурной организации хроматина и структурно-функциональных особенностей линкерного гистона H1 и представителя негистоновых хромосомных белков семейства HMG (от англ. High Mobility Group) белка HMGB1.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание как теоретических основ современных биохимических, молекулярно-биологических и спектрофотометрических методов, так и описание самой методики пробоподготовки и проведения измерений. Материалы и методы соответствуют поставленным задачам диссертационной работы.

Раздел «Результаты и обсуждение» условно можно разделить на две части. В первой части представлены структурные и термодинамические характеристики негистонового хромосомного белка HMGB1 в свободном состоянии и в комплексе с ДНК и линкерным гистонном H1. Вторая часть работы посвящена исследованию характера и расположения посттрансляционных модификаций белков хроматина HMGB1 и H1.

В результате проведенной работы получены следующие результаты:

1. Белок HMGB1 способен изменять свою вторичную структуру в зависимости от объекта связывания.

а) 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.

б) Взаимодействие белка HMGB1 с гистонном H1 приводит к изменениям вторичной структуры как минимум одного из белков.

2. Несмотря на деформацию двойной спирали в месте связывания HMGB1, взаимодействие данного белка с ДНК приводит к увеличению термостабильности двойной спирали ДНК, что выражается в увеличении ее температуры плавления в составе комплекса на 20 °C.

3. Большая часть найденных в белках HMGB1 и HMGB2 модификаций идентичны, в то время как модификации AsK57, AsK76, AsK85, AsK152, AsK154, MetK82, PY78 характерны только для белка HMGB2.

4. Основная часть найденных посттрансляционных модификаций белков HMGB1 и HMGB2 располагается в области А-домена, линкерного участка между двумя HMGB-доменами и RAGE-связывающей последовательности белка, что может оказывать влияние на связывание с белками факторов транскрипции, на пространственную укладку белковой молекулы и выполнение белками внеядерных функций соответственно.

5. Глобулярный домен и С-концевой участок белка H1.0 характеризуются высокой степенью фосфорилирования и метилирования, что может оказывать влияние на связывание белка с ДНК.

6. Среди выявленных в работе модификаций подтипов гистонов H1.1-H1.4 доминируют модификации положительно заряженных остатков лизина в области N- и С-концевых участков, что приводит к уменьшению положительного заряда полипептидной цепи вне ДНК-связывающего глобулярного домена белка.

7. Характер и расположение посттрансляционных модификаций белка HMGB1 и гистона H1 отличаются высокой межвидовой консервативностью.

Достоверность результатов не вызывает сомнений. **Выводы**, сделанные Т.Ю. Старковой, соответствуют поставленной цели и задачам, и сделаны строго в соответствии с полученными результатами.

Замечания к работе.

1. Объединение HMG белков и гистона H1 в единую группу линкерных белков (как это сделано прямо в заглавии работы) представляется крайне неудачным и необоснованным. В литературе существует термин линкерные гистоны (гистоны, которые не входят в состав нуклеосомного ядра, хотя и играют важную роль в поддержании структуры полноразмерной нуклеосомы). Белки группы HMG гистонами не являются и в формировании нуклеосом не участвуют. Если же называть линкерными все белки, которые связываются с линкерной (межнуклеосомной) ДНК, то сюда можно отнести большую часть транскрипционных факторов и прочих белков, так или иначе связывающихся с ДНК.

2. Существенным недостатком является отсутствие обоснования экспериментальных задач. Каждый раздел следовало бы предварить несколькими фразами о том, зачем данные эксперименты делались (что было известно ранее, какие противоречия существовали в ранее опубликованных работах, что представлялось необходимым уточнить, проверить, или изучить заново).

3. Из результатов, заслуживающих внимания, следует отметить идентификацию большого числа новых позиций, по которым осуществляются модификации. Однако функциональное значение

этих модификаций не охарактеризовано. При интерпретации результатов автор допускает фактические ошибки. Например, утверждается, что метилирование гистона H1 может приводить к увеличению положительного заряда полипептидной цепи "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 областях модификаций и, как следствие, увеличения силы его взаимодействия с ДНК". Непонятно, почему присоединение нейтральной группы должно приводить к увеличению положительного заряда.

4. Автор обнаружил, что при связывании с плазмидной ДНК вторичная структура HMGB1 практически не изменяется, а при связывании с ДНК из тимуса телят процент альфа-спиралей существенно увеличивается. К сожалению, автор не пытается объяснить причины выявленных различий. Акцентируется внимание на том, что в одном случае ДНК высокомолекулярная, а в другом - относительно низкомолекулярная. Между тем, существенно более важным может быть то, что ДНК PUC19 и, скорее всего, суперспирализованная (степень суперспирализации используемой плазмидной ДНК стоило бы проверить). Кроме того, плазмидная ДНК может отличаться по АТ-составу, наличию/отсутствию А/Т блоков, присутствию DAM метилирования. Механизм связывания НМГ домена с ДНК охарактеризован. Стоило бы, прежде всего, с использованием техники компьютерного моделирования, попытаться объяснить, как именно может изменяться вторичная структура белка при связывании с ДНК. На основании результатов моделирования и особенностей плазмидной ДНК можно было бы попытаться понять, почему HMGB1 по-разному изменяет вторичную структуру при связывании с плазмидной ДНК и ДНК тимуса телят. К сожалению, здесь, как и в других разделах работы, автор ограничивается констатацией факта.

5. Анализ вторичной структуры белка HMGB1 при взаимодействии с H1. Не совсем понятно, зачем делались представленные в этом разделе эксперименты. Существование комплекса H1-HMGB1 было продемонстрировано до этого. Более того, были сделаны наблюдения, указывающие на возможное биологическое значение формирования данного комплекса (Cato L1, Stott K, Watson M, Thomas 10. The interaction of HMGB1 and linker histones occurs through their acidic and basic tails. 1 Mol Biol. 2008 Dec 31;384(5): 1262-72)

6. Разделы, посвященные характеристике посттрансляционных модификаций HMGB1/2 и разных подтипов. Здесь в целом все выглядит убедительно. Не ясно только, почему автору удалось идентифицировать так много новых позиций, по которым происходят модификации. Спектры модификаций НМГ белков и гистона H1 исследовались и ранее, в том числе и с использованием масс-спектрометрии (например, Snijders et al., 2008, J Proteome Res. 7(10):4326-35). Авторам следовало бы как то обсудить это обстоятельство (например, разумно было бы показать, как часто

встречается каждая из обнаруженных модификаций).

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты диссертации Т.Ю. Старковой можно рекомендовать к использованию в исследованиях, посвященных изучению структурной организации хроматина, а также при чтении курсов лекций по молекулярной биологии в высших учебных заведениях России. Материалы работы опубликованы в 7 статьях в рецензируемых журналах (из них 3 в изданиях Web of Science и 5 — Scopus), в том числе 5 — в журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций. Результаты диссертационной работы были представлены на 11 российских и международных конференциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Старковой Татьяны Юрьевны на тему «Структурно-функциональные особенности «линкерных» белков хроматина HMGB1 и H1» представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 — молекулярная биология, является законченным самостоятельным научно-квалифицированным исследованием, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.01.03 — молекулярная биология, а ее автор заслуживает искомой ученой степени.

Диссертационная работа и отзыв обсуждены и одобрены на заседании Отдела пептидно-белковых технологий ФГБУН ИБХ РАН (протокол № 15 от 28 мая 2015г).

Руководитель отдела
пептидно-белковых технологий ИБХ РАН
зав. лаб. химии пептидов, академик



Иванов В.Т.