

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **СТАРКОВОЙ ТАТЬЯНЫ ЮРЬЕВНЫ**
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 19 июня 2015 года № 198/377

О присуждении **СТАРКОВОЙ ТАТЬЯНЕ ЮРЬЕВНЕ** (Россия) ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ «ЛИНКЕРНЫХ» БЕЛКОВ ХРОМАТИНА HMGB1 И H1**»

По специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Принята к защите 10.04.15г., протокол № 197/376а Диссертационным советом Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, адрес: Тихорецкий пр., д.4, Санкт-Петербург 194064, Россия, утвержден приказом Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2012г.

Соискатель **Старкова Татьяна Юрьевна**, 1986 года рождения, в 2011 году закончила физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета по специальности «физика» по профилю специализации «молекулярная биофизика», с присвоением степени магистра. С **01. 06. 2011 по 03. 02. 2015** (включая декретный отпуск) проходила очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук. Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры. **Работает** в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН с 2011 года в Лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток, с марта 2015 года и по настоящее время Татьяна Юрьевна является младшим научным сотрудником.

Диссертация выполнена в Лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Научные руководители:

1. **Томилин Алексей Николаевич**, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией молекулярной биологии стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук
2. **Чихиржина Елена Всеволодовна**, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник Лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук

Официальные оппоненты:

1. **Паткин Евгений Львович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной цитогенетики развития млекопитающих Отдела Молекулярной генетики ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург
2. **Конев Александр Юрьевич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики эукариот Отдела молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ «ПИАФ» НИЦ КИ, г. Гатчина, Ленинградской обл.

Дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация:

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, (Москва) в своем положительном отзыве (заключение составлено руководителем отдела пептидно-белковых технологий ФГБУН ИБХ

РАН, зав. лаб. химии пептидов, академиком В.Т. Ивановым и утверждено директором ФГБУН Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук В.Т. Ивановым) указала, что диссертационная работа является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, а ее автор заслуживает искомой ученой степени.

Дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ по теме диссертации, из них 7 статей (5,5 печатных листов) в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 11 тезисов докладов.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. **Родионова (Старкова) Т.Ю.,** Чихиржина Е.В., Воробьев В.И., Поляничко А.М. 2009. Изменение вторичной структуры белка HMGB1 при связывании с ДНК. Журнал структурной химии. 50(5): 1014–1020. Статья посвящена исследованию стадии некооперативного взаимодействия негистонового хромосомного белка HMGB1 с ДНК в условиях 15 mM NaCl. Установлено, что комплексообразование сопровождается компактизацией молекулы ДНК в достаточно широком диапазоне отношений белок/ДНК в комплексе. Установлено, что изменения в структуре белка (увеличение степени α -спиральности HMGB1 в связанном состоянии на 20 %) происходят в условиях избытка мест связывания белка на ДНК.

2. **Родионова (Старкова) Т.Ю.**, Чихиржина Е.В., Курилов Р.В., Скворцова Е.В., Поляничко А.М. 2010. Изменение вторичной структуры HMGB-домена при связывании с ДНК. Электронный журнал «Структура и динамика молекулярных систем». № 8, А: 14–19 http://www.ksu.ru/sdms/sdms_8_2010.pdf

Статья посвящена исследованию вторичной структуры негистонового хромосомного белка HMGB1 в свободном состоянии и в составе ДНК-белкового комплекса в условиях различных ионных сил.

3. Поляничко А.М., **Родионова (Старкова) Т. Ю.**, Воробьев В.И., Чихиржина Е.В. 2011. Конформационные особенности ядерного белка HMGB1 и специфика его взаимодействия с ДНК. Цитология. 53 (1): 55–60. В рамках данной статьи методами кругового дихроизма и УФ спектроскопии изучены изменения вторичной структуры в молекулах ДНК и негистонового хромосомного белка HMGB1 в условиях 15 мМ NaCl, что соответствует физиологической концентрации данной соли в ядре клетки. Проведена оценка доли связанного белка в зависимости от весового соотношения белок/ДНК в растворе.

4. Chikhirzhina E., **Starkova T.**, Kostyleva E., Polyanychko A. 2012. Spectroscopic Study of the Interaction of DNA with the Linker Histone H1 from Starfish Sperm Reveals Mechanisms of the Formation of Supercondensed Sperm Chromatin. Spectroscopy: An International Journal. 27 (5-6): 433–440. doi:10.1155/2012/250489. Статья посвящена исследованию спектроскопических и термодинамических характеристик взаимодействия линкерного спермий-специфического гистона H1 звезды «*Aphelasterias japonica*» с ДНК. На примере данной ДНК-белковой системы отработана методика анализа данных термической денатурации ДНК в свободном состоянии и в составе ДНК-белкового комплекса.

5. Chikhirzhina E., **Starkova (Rodionova) T.**, Polyanychko A. 2014. Interaction between Chromosomal Protein HMGB1 and DNA Studied by DNA-Melting Analysis. Journal of Spectroscopy. ID 387138 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/387138>

Методами кругового дихроизма и термической денатурации ДНК в рамках данной статьи исследованы термодинамические характеристики ДНК-HMGB1 комплекса. Установлено, что плавление ДНК в комплексе с белком представляет собой двухфазный процесс. Охарактеризованы температуры плавления свободных и связанных с HMGB1 участков ДНК в условиях 0,25 мМ ЭДТА. Проведена оценка доли связанной ДНК в зависимости от весового соотношения белок/ДНК в растворе.

6. **Starkova (Rodionova) T.**, Mikhailov N., Kostyleva E., Chikhirzhina E., Polyanichko A. 2013. Interaction between linker histone H1 and non-histone protein HMGB1 in vitro. FEBS Journal. 280 (Suppl. 1): 129. В рамках данной работы методами электрофореза и УФ спектроскопии были изучены особенности взаимодействия между линкерным гистоном H1 и негистоновым хромосомным белком HMGB1 in vitro. Показано, что H1 и HMGB1 имеют тенденцию к формированию молекулярных комплексов по типу гетеродимера. Данные кругового дихроизма свидетельствуют, что в процессе формирования комплекса происходят изменения вторичной структуры, по меньшей мере, одного из белков.

7. Sitnikova A., **Starkova (Rodionova) T.**, Artamonova T., Karpenko V., Polyanichko A., Chikhirzhina E., Kostyleva E., Tomilin A. 2013. Application of mass spectrometry to the characterization of post-translational modifications of chromosomal proteins. FEBS Journal. 280 (Suppl. 1): 131. 24. В рамках данной работы проведено исследование возможности применения стандартных методик ферментативного гидролиза и анализа белков методом МАЛДИ масс-спектрометрии для выявления посттрансляционных модификаций негистонового хромосомного белка HMGB1 и подтипов линкерного гистона H1.

8. **Старкова (Родионова) Т.Ю.**, Бабич А.В., Костылева Е.И., Скворцова Е.В., Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Томилин А.Н. 2014. Исследование посттрансляционных модификаций ядерных белков хроматина H1 и HMGB1/2 методами МАЛДИ и электроспрей масс-спектрометрии. Тезисы докладов и сообщений XVII Всероссийского симпозиума «Структура и функции клеточного

ядра». Цитология. 56(9): 682. В рамках данной публикации проведено исследование посттрансляционных модификаций «линкерных» белков хроматина HMGB1, HMGB2 и H1. Установлено, что выявленные сайты ацетилирования, метилирования и фосфорилирования расположены в функционально-значимых участках полипептидной последовательности белков.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Профессора кафедры биологии, доктора биологических наук ФГБОУ ВПО «Тамбовского государственного университета им. Г.Р. Державина» **А.В. Емельянова**. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Доцента кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров, кандидата физико-математических наук ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» **С.В. Пастон**. Отзыв положительный, имеются критические замечания.

«Автореферат позволяет заключить, что автором проделана весьма значительная и скрупулезная работа. Хочется отметить тщательную обработку спектров кругового дихроизма, позволившую получить важные и достоверные количественные результаты. Вместе с тем, по моему мнению, из представленных кривых плавления ДНК в комплексе с HMGB1 (рис.5) можно было бы извлечь больше информации. На приведенных на рис.5 дифференциальных кривых плавления явно заметно (за пределами указанной погрешности) смещение главного максимума, соответствующего плавлению свободных участков ДНК, в область меньших T при $r=0.15$ и затем в область больших T при дальнейшем росте r по сравнению с T_m' ДНК в свободном состоянии. Возможно, это указывает на двухстадийность процесса связывания ДНК с HMGB1. Также на дифференциальных кривых плавления виден резкий скачок в области $T_m'' = (62,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, соответствующей плавлению участков ДНК, связанных с белком. Этот эффект в тексте автореферата также не обсуждается. Однако, эти замечания носят непринципиальный характер и не влияют на общее, весьма благоприятное, впечатление от прочтения автореферата.

В целом автореферат свидетельствует, что работа Татьяны Юрьевны Старковой полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология».

3. Кандидата биологических наук, заведующего лабораторией НИЛ Молекулярной кардиологии ФГБУ «Северо-западный федеральный исследовательский центр»

А.Б. Малашичевой. Отзыв положительный, без замечаний.

4. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника группы Биоинформатики и Функциональной геномики ФГБУН «Институт цитологии РАН» **О.В. Анацкой.** Отзыв положительный, содержит замечания.

«Автореферат написан четким стилем, выводы сформулированы ясно и подчеркивают наиболее важные результаты. В реферате есть лишь одна небольшая неточность – двум небольшим разным главам даны одинаковые названия. Также, может быть, было бы не лишним немного расширить раздел методы, внося туда описание применения метода кругового дихроизма. Указанные мелкие замечания никак не уменьшают ценность работы».

5. Кандидата биологических наук, доцента кафедры биохимии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» **Т.В. Гришиной.** Отзыв положительный, содержит замечания.

«Автореферат достаточно полно отражает диссертационную работу. Однако в оформлении есть неточность: две главы имеют одинаковое название «анализ вторичной структуры белка HMGB1 при взаимодействии с ДНК».

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук **С.Ю. Хайтлина**, член Совета;
2. Профессор, доктор биологических наук **М.И. Мосевичкий**, член Совета;

3. Профессор, доктор биологических наук **Д. С. Боголюбов**, член Совета;
4. Доктор физико-математических наук **А.Л. Тимковский**, член Совета;
5. Академик **Н.Н. Никольский**, член Совета.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области молекулярной биологии, в частности исследования структурно-функциональных особенностей белков и пептидов, для более объективной оценки результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная концепция о механизмах связывания негистонового хромосомного белка HMGB1 с белковой и ДНК-овой мишенями, обогащающая существующее представление о структурной организации хроматина соматических клеток млекопитающих;

предложена научная гипотеза, получившая экспериментальное подтверждение, о формировании белок-белкового структурно-регуляторного комплекса негистонового хромосомного белка HMGB1 и гистона H1 на линкерном участке ДНК;

доказано, что при формировании комплекса белок HMGB1 способен изменять свою вторичную структуру при связывании как с ДНК, так и с гистонами H1. При этом регуляция ДНК-белкового и белок-белкового взаимодействия может осуществляться за счет наличия посттрансляционных модификаций в белках;

доказано, что посттрансляционные модификации негистоновых хромосомных высоко гомологичных белков HMGB1 и HMGB2, расположенные в функционально-значимых участках полипептидной последовательности, различны. Ацетилирование по лизину в положениях 57, 76, 85, 152 и 154, метилирование по лизину в положении 82 и фосфорилирование по тирозину в положении 78 характерны только для белка HMGB2; **доказано**, что 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.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, вносящие вклад в расширение представлений о структурно-функциональных особенностях «линкерных» белков хроматина HMGB1 и H1;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных методов молекулярной биологии, включающих экстракцию белков из ткани зубной железы млекопитающих и культуры клеток, культивирование бактериальных клеток и выделение из них плазмидной ДНК, УФ спектрометрию, спектроскопию кругового дихроизма, плавление ДНК со спектрофотометрической регистрацией, одномерный и двухмерный электрофорезы, масс-спектрометрию, а также методы статистической обработки данных;

изложены новые экспериментальные факты о роли негистонового хромосомного белка HMGB1 в структурной организации хроматина соматических клеток млекопитающих. Получены новые данные о расположении посттрансляционных модификаций «линкерных» белков хроматина HMGB1 и H1 в функционально-значимых участках полипептидной последовательности белков;

изучены структурные и термодинамические характеристики белка HMGB1 в свободном и в связанном с ДНК и H1 состоянии;

раскрыта способность HMGB1 изменять свою вторичную структуру при формировании ДНК-HMGB1 и HMGB1-H1 комплексов;

охарактеризовано влияние ионной силы раствора на процесс структуризации HMGB1 при формировании ДНК-HMGB1 комплекса;

проведена оценка размера участка связывания HMGB1 на ДНК и доли связанной ДНК в растворе.

Значение полученных соискателем результатов для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены в практику научного исследования методология комплексного исследования и анализа особенностей ДНК-белковых систем; анализа посттрансляционных модификаций белков, полученных как из тканей, так и из клеточных культур;

представлены новые данные о роли негистонового хромосомного белка HMGB1 и линкерного гистона H1 в структурной организации хроматина соматических клеток млекопитающих. Согласно полученным данным, увеличение отрицательного заряда в процессе ацетилирования в области N- и C-концевых доменов гистона H1 может приводить к нарушению его связывания с ДНК и способствовать формированию фибриллы с меньшей плотностью упаковки и, как следствие, может оказывать непосредственное влияние на доступ к ДНК структурно-регуляторных белков, в частности HMGB1, и транскрипционных факторов. Согласно полученным данным, функционирование негистонового хромосомного белка HMGB1 опосредовано наличием как минимум двух видов регуляции: введением клеточной системой посттрансляционных модификаций и наличием механизма структурной адаптации к объекту связывания.

В связи со способностью HMGB-доменных белков выступать в роли посредников при переносе данного препарата в ядро клетки **определены** перспективы возможного практического применения полученных результатов исследования при создании фармакологических подходов разработки противоопухолевых препаратов на основе координационных соединений платины (II), в частности цисплатина.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании, выбор использованных методов обоснован спецификой работы и

поставленными в работе задачами, достоверность экспериментальных результатов оценена с помощью адекватных методов статистической обработки данных.

Теория о возможном объяснении многообразия выполняемых белком HMGB1 функций наличием посттрансляционных модификаций и механизма структурной адаптации к объекту связывания построена на известных и проверенных литературных фактах и данных о структурно-функциональных особенностях других представителей семейства HMGB, и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации.

Идея базируется на анализе современных литературных данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала.

Использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике.

Установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обосновано.

Использованы современные экспериментальные подходы (экстракция белков из ткани зубной железы млекопитающих и культуры клеток, культивирование бактериальных клеток и выделение из них плазмидной ДНК, УФ спектрометрия, спектроскопия кругового дихроизма, плавление ДНК со спектрофотометрической регистрацией, одномерный и двухмерный электрофорез, масс-спектрометрия) и адекватные методы статистической обработки результатов (с использованием компьютерных программ Microsoft Excel, OrindginPro, Mascot, ProteinProspector).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке и анализе и интерпретации экспериментальных данных, полученных с помощью современных молекулярно-биологических методов. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований на отечественных и зарубежных научных конференциях, в подготовке и написании

статей и тезисов по теме диссертации. Диссертация, посвященная изучению структурно-функциональных особенностей «линкерных» белков хроматина NMGB1 и H1, является законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области молекулярной биологии, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

На заседании 19 июня 2015 г. диссертационный совет принял решение присудить Старковой Татьяне Юрьевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология (03.01.03).

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 8 по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 24 человек, входящих в состав Совета, проголосовали:

«ЗА» 21, «ПРОТИВ» нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

доктор биологических наук, профессор

А.Л. Юдин

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

кандидат биологических наук

« 22 » июня 2015 г.



Е.В. Каминская