

Отзыв

официального оппонента Николаева Льва Григорьевича на диссертацию Сивкиной Анастасии Львовны “Роль субъединиц и доменов комплекса FACT в разворачивании нуклеосом”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Выяснение механизмов регуляции активности генома клетки эукариот – это наиболее фундаментальная задача современной молекулярной биологии. Регуляция эта протекает на различных уровнях – от геномных доменов, содержащих большое число генов различной природы, до точечных модификаций ДНК и гистоновых и негистоновых белков. Одним из важных структурных элементов в этой иерархии является нуклеосома – компактная частица, содержащая октамер гистонов и фрагмент ДНК длиной 147 п.о. Упакованная в нуклеосому ДНК малодоступна для протекания важнейших клеточных процессов, таких как транскрипция, репликация и репарация ДНК, поэтому доступность нужных областей ДНК в хроматине должна обеспечиваться в своих для каждого типа клеток участках при помощи соответствующих механизмов ремоделирования. Одним из инструментов такого ремоделирования являются гистоновые шапероны различных типов, и исследованный в данной работе белковый комплекс FACT представляет собой один из таких шаперонов.

Диссертационная работа Анастасии Львовны Сивкиной представляет собой органичную часть большого цикла работ, проводящихся в течение ряда лет в нескольких лабораториях МГУ им. М.В. Ломоносова и Российской академии наук, и посвященного связи структуры хроматина и его функционирования. Сказанное выше позволяет утверждать, что представленное А. Л. Сивкиной исследование посвящено весьма актуальной теме, имеющей большое фундаментальное и прикладное значение.

Диссертационная работа А. Л. Сивкиной выстроена в основном по традиционной схеме и содержит введение, обзор литературы, методический раздел, а также изложение и обсуждение полученных результатов. Приведено также несколько приложений, поясняющих суть полученных результатов.

В обзоре литературы, посвященном структуре и функционированию гистонового шаперона FACT, автором суммированы полученные к настоящему времени данные в этой области, включая самые последние работы. Особое внимание уделено, как и следовало ожидать, данным о механизме реструктурирования нуклеосом под действием FACT. При этом А. Л. Сивкиной продемонстрировано хорошее владение современной литературой и способность к ее анализу. Тем не менее, к этому разделу имеются несколько замечаний:

1. Хотя в основном обзор литературы написан хорошим языком, в тексте встречаются абзацы, затруднительные для понимания, и напоминающие плохо отредактированный гуглоперевод. Например, на стр. 34: “В этом же исследовании были выявлены значимые позиции в доменах (в Spt16 положениях 972, 968, 969) и H2B-гистоне, особенно две ключевые аминокислоты, предположительно влияющие на связывание гистонового димера с заряженными концами (тирозин в 45 положении и метионин в 62 положении)”.

2. Стр. 10 подпись к рис. 1 – ТАД не является петлей.

3. Ссылки 23, 31, 115, 117, 123 указывают на статьи, не имеющие отношения к обсуждаемому в тексте материалу.

Раздел “Методы” содержит в основном достаточно полное описание большинства использованных методик. Методически работа выполнена на самом современном уровне, с применением большого арсенала биохимических и физических методов, таких как spFRET конфокальная микроскопия, электронная микроскопия с компьютерной обработкой изображений и др. К этому разделу также имеется ряд замечаний:

1. Не описан использованный А. Л. Сивкиной в работе метод FRET-в-геле.

2. Хроматин эритроцитов цыплят (стр. 47) и так практически не содержит гистона H1, зато содержит большое количество линкерного гистона H5. Об его удалении в методах не упоминается.

Раздел “Результаты и обсуждение” состоит из 5 глав, в которых суммированы основные результаты работы.

В главе 3.1 А. Л. Сивкиной исследована структура белкового комплекса FACT дрожжей и его взаимодействие с белком Nhrb, а также выявлена конформационная подвижность дрожжевого и человеческого FACT.

В главе 3.2 автор исследует механизмы разворачивания нуклеосом и показывает необходимость присутствия избытка Nhrb для проявления активности FACT дрожжей и разворачивания ДНК нуклеосомы в линейный фрагмент без отделения гистонового октамера. Предложена модель разворачивания нуклеосомы под действием комплекса FACT дрожжей.

В главе 3.3 автор демонстрирует активность комплекса FACT по отношению к субнуклеосомным частицам и хроматосомам.

Глава 3.4 содержит доказательства необходимости C-концевых участков субъединиц FACT для проявления его ремоделирующей активности.

Наконец, в главе 3.5 исследованы особенности проявления ремоделирующей активности FACT в присутствии производного карбазола кураксина CBL0137.

По этому разделу также имеется ряд замечаний:

1. Стр. 55. Аспарагин не является отрицательно заряженной аминокислотой.
2. Стр. 59. “На денатурирующий электрофорез были нанесены около 4 мкмоль каждого из вариантов Spt16/Pob3 в комплексе с Nhp6...” – 4 мкмоль только Spt16 составит ~400 мг.
3. Стр. 62. “разрешаются три электронные плотности”. Электронная плотность – это все же свойство, а не предмет, правильно было бы “три области высокой электронной плотности”.
4. Стр. 69, рис. 18А. По оси ординат отложена “относительная частота”, в подписи же указано некое “относительное количество нуклеосом”. В то же время имеется вполне принятый в статистике термин “частота встречаемости”. Тут же можно добавить, что почему-то р-значения (а лучше бы приведенные q-значения) рассчитаны только для эксперимента на рис. 27.
5. Стр. 75 и другие. Не очень понятно, в каком смысле используется автором термин “диада”.
6. Стр. 80. Из описания эксперимента можно понять, что в тетрасоме отсутствуют оба димера H2A-H2B. В то же время на стр. 110 указано, что в тетрасоме содержится один такой димер.
7. Стр. 82, рис. 25. Отсутствуют метки положения C_{у3} и C_{у5} на ДНК.
8. Стр. 90. “кураксинов – антираковых препаратов, состоящих из 9AA” – непонятно, что такое 9AA.

Несмотря на указанные, в основном мелкие, погрешности, работа производит прекрасное впечатление по объему примененных современных методов и полученных результатов, и приведенные выше замечания не снижают ее ценности. Выводы работы хорошо обоснованы результатами приведенных экспериментов и не вызывают сомнения.

Диссертация написана в основном ясным языком и очень хорошо иллюстрирована. Результаты работы опубликованы в 8 статьях в российских и международных журналах, а также представлены на международных и российских конференциях. Работа Анастасии Львовны Сивкиной полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3 –Молекулярная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова. Работа

оформлена согласно приложениям №5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Соискатель Сивкина Анастасия Львовна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 –Молекулярная биология.

Официальный оппонент, доктор биологических наук, вед. н.с. Института биоорганической химии РАН им. академиков М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова

Николаев Лев Григорьевич

Контактные данные: тел. +7-495-330-6992, e-mail lev@ibch.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы: 117997, Москва, ГСП7, ул. Миклухо-Маклая 16/10, тел. +7495 335-0100, e-mail office@ibch.ru

Подпись Л.Г. Николаева удостоверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН,

докт. физ.-мат. наук

