

Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу Боголюбовой Ирины Олеговны
"Структурно-функциональная организация ядра в период активации
эмбрионального генома мыши", представленную на соискание ученой
степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 –
клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы. Работа И.О.Боголюбовой посвящена одной из центральных проблем современной молекулярной клеточной биологии – функциональной организации ядра эукариотической клетки. К настоящему времени сформировано представление об интерфазном ядре как совокупности трех основных компонентов: хромосомных территорий (хроматинового компартмента), ядрышка и межхроматинового пространства, в котором сосредоточены разнообразные ядерные тельца. В настоящее время не вызывает сомнения, что любые процессы в ядре и контроль их осуществления обеспечивается при взаимодействии всех ядерных компартментов. Многочисленные исследования указывают на то, что пространственная организация эукариотического генома и функциональная компартментализация клеточного ядра играют важную роль в регуляции активности генов. Однако, основные усилия исследователей направлены на изучение трехмерной организации генома, тогда как структурно-функциональная организация и молекулярный состав ядерных телец межхроматинового пространства, особенно в моменты инициации и терминализации транскрипции охарактеризованы недостаточно полно. Еще менее изучены различные ядерные тельца межхроматинового пространства и их взаимоотношения в зиготе и в начале индивидуального развития, когда происходят глобальные преобразования хроматина пронуклеусов и активируется геном эмбриона. Исследования такого классического объекта биологии развития как мышшь вносят существенный вклад в создание целостной картины преобразований ядра на стартовых этапах реализации программы развития. Эмбрионы на стадии дробления представляют собой естественную модель для изучения механизмов формирования ядерных доменов в процессе последовательного включения эмбриональных генов и эпигенетического репрограммирования генома. Несмотря на то, что многие параметры АЭГ (стадия, гены-триггеры) видоспецифичны, результаты исследований организации клеточного ядра у эмбрионов мыши представляются весьма значимыми для понимания начальных этапов эмбриогенеза других млекопитающих и человека. Уместно отметить также, что изучение структурно-функциональных доменов может привести к новым возможностям для объяснения патогенеза наследственных и онкологических заболеваний. Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности исследований для разных областей фундаментальной и прикладной науки.

Общая характеристика рукописи. Работа построена по традиционному плану, состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материал и методы, результаты и обсуждение), заключения и выводов. Список литературы включает 564 источника, в т.ч. 18 – русскоязычных. Работа компактна - изложена на 256 страницах, содержит 62 рисунка и 8 таблиц. Работа хорошо оформлена, иллюстрирована информативными микрофотографиями. Все разделы написаны достаточно четко, поэтому легко воспринимаются.

Во введении в сжатой форме обрисовано современное состояние исследований, продемонстрирована недостаточность данных о структурно-функциональной организации клеточного ядра в первых делениях дробления. Обоснованы цель и задачи исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту. Суммированы данные, полученные соискателем впервые, представлена их теоретическая значимость.

Обзор литературы дает полное представление об истории и современном состоянии проблемы, свидетельствует об эрудиции и глубоком анализе данных по теме диссертации соискателя. Представлены схемы (рисунки) и таблицы, облегчающие восприятие текста. Обзор литературы содержит 2 подглавы:

1) "Доменная организация клеточного ядра", где даны общие представления о структурно-функциональной компартментализации клеточного ядра, охарактеризованы основные ядерные компартменты (хроматиновый компартмент, ядрышко и экстрахромосомные ядерные домены). Подробно рассмотрены кластеры интерхроматиновых гранул и тельца Кахаля, так как изучение этих универсальных ядерных доменов в раннем эмбриогенезе мыши входило в перечень задач исследования. Внимание уделено роли актина в организации ядра, а также его полифункциональности, в т.ч. участию в транскрипции.

2) "Ранние эмбрионы млекопитающих как модель для изучения ядерной компартментализации". Даны современные толкования процессов, происходящих в первых делениях дробления, при переходе от материнской к эмбриональной программе развития, которую принято теперь называть «переход от ооцита к эмбриону» (oocyte-to-embryo transition, ОЕТ) и частью которой является собственно активация эмбрионального генома (АЭГ). Приведены данные о хронологии и основных признаках АЭГ у разных видов млекопитающих. Рассматривая регуляторные механизмы АЭГ, автор приводит существующие гипотезы (ядерно-цитоплазматического отношения, «зиготических часов», "коротких транскриптов", "эпигенетической некомпетентности хроматина зиготы к транскрипции", "зон открытого хроматина"). Последние 2 раздела главы посвящены эпигенетическим модификациям хроматина (пострансляционным модификациям гистонов и метилированию ДНК), которые занимают важное место в системе регуляции АЭГ.

В заключение автор отмечает, что ядро ранних эмбрионов млекопитающих является чрезвычайно динамичной системой, в которой

параллельно происходят разнообразные молекулярные, биохимические, структурные преобразования, при этом все эти процессы тесно взаимосвязаны и скоординированы между собой. Однако, расшифровка всех регуляторных механизмов, лежащих в основе АЭГ, пока далека от своего завершения.

Глава Материал и методика написана достаточно подробно, понятны этапы всех методов и подходов. При получении эмбрионов соблюдены международные этические требования к экспериментам на животных и требования Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных целях (Страсбург, 18.03.1986). По набору методов работа современна и комплексна. Арсенал методов включает: получение зигот и эмбрионов, микроманипуляции с эмбрионами, различные варианты иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии, молекулярные методы, фотометрию, статметоды.

Глава 3 "Результаты и обсуждение" структурирована в соответствии с поставленными задачами и содержит 3 части.

1) "Структурная организация ядер эмбрионов мыши в период АЭГ" посвящена кластерам интерхроматиновых гранул (морфогенез и молекулярный состав), коилин- и симплекин-содержащим структурам, проядрышкам и ассоциированному с ними гетерохроматину. 2) "Структурно-функциональная организация ядер эмбрионов мыши в состоянии «двухклеточного блока in vitro», где приводятся данные об особенностях строения блокированных эмбрионов ядер, их транскрипционной активности и локализации факторов транскрипции и сплайсинга мРНК. Третья часть посвящена актину, особенностям его локализации и функций в ядрах ранних эмбрионов мыши.

Каждая из подглав завершается *обсуждением*, в котором проводится детальный и всесторонний анализ полученных результатов.

В разделе *Заключение* подведены итоги всей работе. На рис.62 в диссертации (рис.16 в автореферате) графически представлены основные тенденции структурных преобразований ядерных компартментов в период АЭГ, суммированы полученные данные о их молекулярном составе у ранних эмбрионов мыши. Подчеркивается, что организация ядерных компартментов до АЭГ и на этапах ее реализации обладает целым рядом специфических особенностей, которые необходимо учитывать при обобщении данных, полученных на разных модельных объектах, и построении универсальных концепций трехмерной организации работы эукариотического генома.

В целом полученные данные расширяют современные представления о структурно-функциональной компартментализации клеточного ядра, позволяют выделить общие и специфические особенности структурной организации ядер в раннем эмбриогенезе млекопитающих.

Результаты масштабной, тщательно продуманной, скрупулезно выполненной И.О.Боголюбовой работы обладают несомненной **научной новизной**. В значительной степени этому способствовала комплексность

подхода к анализу клеточных ядер на ранних стадиях дробления эмбрионов мыши. Впервые с помощью эмбриологических, цитологических и молекулярных методов прослежена динамика формирования и охарактеризованы изменения молекулярного состава основных ядерных компартментов (КИГ, коилинсодержащих телец, проядрышек и ассоциированного с проядрышками гетерохроматина), а также перераспределения ключевых компонентов метаболизма мРНК в ядре в период АЭГ у мыши. Продemonстрировано, что изменения транскрипционного статуса сопровождаются перераспределением компонентов транскрипции и метаболизма РНК, что в свою очередь приводит к изменению доменной организации ядра. Впервые у 1—2-клеточных эмбрионов мыши описаны различные типы организации транскрипционно инертных ядер: до начала АЭГ, после искусственного подавления транскрипции и при блоке развития *in vitro*.

В частности, получены новые факты, указывающие на возможную полифункциональность проядрышек в эмбрионах мыши. Впервые в составе этих структур обнаружены некоторые компоненты (Y14 и NXF1/TAP) комплекса связи экзона. В составе транскрипционно инертного гетерохроматина, ассоциированного с проядрышками, обнаружены эпигенетические метки как репрессированного, так и активного хроматина (H3me3K9 и H4acK5, соответственно). Охарактеризована динамика изменения молекулярного состава ассоциированного с проядрышками гетерохроматина в период АЭГ, показано, что на ранних (транскрипционно неактивных) стадиях в его составе выявляются некоторые факторы метаболизма мРНК (фактор сплайсинга SR-белок SC35 и базальный фактор транскрипции TFIID). Обнаружена гетерогенность популяции проядрышек по составу окружающего их гетерохроматина. Продemonстрировано накопление фибриллярного актина в проядрышках при искусственном подавлении транскрипции. Показана колокализация актина и факторов экспорта мРНК в области ассоциированного с проядрышками гетерохроматина, особенно выраженная при искусственном подавлении транскрипции. С помощью FRET-анализа в проядрышках и интерхроматиновой области ядра показано тесное пространственное взаимодействие актина и факторов экспорта мРНК, которое имеет РНК-зависимый характер.

Обнаружено, что при сохранении своей ультраструктурной организации ядра заблокированных *in vitro* 2-клеточных эмбрионов характеризуются значительным перераспределением ряда ключевых факторов транскрипции и сплайсинга мРНК, а снижение транскрипционной активности начинается еще до остановки дробления.

Разработан комплексный подход с использованием различных флуоресцентных маркеров актина, позволяющий проводить сравнительный анализ локализации его разных функциональных форм (G-актин, F-актин и олигомеры актина). Впервые описаны различные паттерны внутриядерного распределения актина при использовании антител к С- и N-концам

молекулы. Полученные данные позволяют предположить непосредственное вовлечение актина в экспорт мРНК в ранних эмбрионах мыши.

На основе полученных данных разработана модель поэтапного формирования дефинитивной структуры клеточного ядра в период АЭГ, выделены общие и специфические особенности структурной организации ядер в раннем эмбриогенезе млекопитающих.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационного исследования расширяют представления о механизмах АЭГ у мыши. Исследование проведено на принципиально новой модели для анализа ядерной компартментализации в условиях поэтапного изменения транскрипционной активности, что позволило получить новые данные об общих закономерностях организации ядра, а также детально охарактеризовать специфические особенности ядерных доменов у 1-2 клеточных эмбрионов.

Полученные данные представляют собой основу для разработки новых критериев для оценки качества эмбрионального материала. Методы, иммуноцитохимического мечения, адаптированные для эмбрионов на стадии дробления и позволяющие одновременно обрабатывать большое число эмбрионов в одинаковых условиях, могут существенно повысить эффективность иммуноморфологического анализа эмбрионального и проэмбрионального материала.

Материалы работы могут быть использованы в курсах лекций по биологии и генетики развития, клеточной биологии.

По прочтении диссертации возникли комментарии и вопросы дискуссионного плана:

1. Несмотря на то, что в обзоре литературы освещены современные данные о хроматине, при обсуждении полученных результатов этот обязательный компонент любого ядра практически не упоминается. Было бы целесообразно также в Заключение к диссертации, которая называется "Структурно-функциональная организация ядра в период активации эмбрионального генома", уделить несколько больше внимания организации собственно генома за счет имеющихся данных литературы, что позволило бы создать цельную картину преобразований ядра и ядерных компартментов в начале индивидуального развития.
2. Незаслуженно мало уделено внимания особенностям организации женского и мужского пронуклеусов с учетом кардинальных различий в организации этих клеточных структур, содержащих гаплоидное число хромосом. Тем более, в работе они исследованы, получены данные о различиях молекулярного состава и морфологических особенностях ядерных доменов в пронуклеусах ранней и поздней зиготы. Хотелось бы уточнить фазу клеточного цикла, которым соответствуют по времени ранняя и поздняя зигота. К сожалению, все эти особенности

проигнорированы и на рис.62 (рис.16 в Автореферате), что выглядит досадным упущением. Представляется также, что употребление термина "ядро" по отношению к зиготе или к "1-клеточному эмбриону" не совсем корректно.

3. В работе исследованы нормально развивающиеся эмбрионы и с остановкой развития после 1-го деления дробления. Есть ли данные (или предположения) о специфических особенностях организации ядерных доменов у эмбрионов, полученных при ЭКО, а также в ядрах при хромосомном дисбалансе по отдельным хромосомам или целым геномам, партеногенетических (андро- и гионогенетических). Перспективны ли исследования в этом направлении?
4. Вопрос о практическом значении результатов работы - о разработке морфологических критериев оценки качества эмбрионального материала. Сейчас при ВРТ основные усилия направлены на анализ хромосомного дисбаланса у эмбрионов на стадии бластоцисты методами матричной геномной гибридизации или секвенирования. Хотелось бы услышать компетентное мнение Ирины Олеговны относительно информативности проядрышкового теста, который внедрялся в некоторых центрах ВРТ, а также других маркеров для селекции эмбрионов человека, полученных при ЭКО.

Эти вопросы не подвергают сомнению достоверность и обоснованность выводов и не умаляют достоинств выполненной И.О.Боголюбовой работы, которая представляет собой многолетний, добротный, законченный труд, относящийся к разряду фундаментальных. Все экспериментальные результаты получены лично Ириной Олеговной, ей принадлежит ведущая роль в выборе направления исследований, анализе и обобщении полученных результатов, в подготовке публикаций. Фамилии соавторов указаны в соответствующих публикациях. Результаты получены с использованием комплекса современных молекулярных, и иммуноцитохимических методов исследования. Арсенал использованных методов исследования адекватен поставленным задачам. Полученные данные тщательно обработаны, обдуманны. Поэтому достоверность и обоснованность выводов диссертации не вызывает сомнения. Выводы сформулированы очень конкретно, корректно по отношению к результатам.

Материалы диссертации освещены в 42 публикациях, в том числе в 19 статьях в журналах, входящих в список ВАК или в международные базы данных Web of Science и Scopus, 1 главе в зарубежной коллективной монографии, 3 статьях в сборниках, 19 тезисов докладов, представленных на отечественных и международных конференциях.

Автореферат содержит основные положения и материалы диссертации, дает полное представление об объеме, всех этапах экспериментальной работы, полученных результатах и выводах.

Заключение. Диссертационная работа Ирины Олеговны Боголюбовой на тему «Структурно-функциональная организация ядра в период активации эмбрионального генома мыши» является законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием, в котором на основании предложенных автором разработок и самостоятельно выполненных исследований осуществлено решение актуальной научной проблемы – структурно-функциональной организации клеточного ядра в раннем эмбриогенезе млекопитающих, что имеет принципиально важное значение для дальнейшего развития науки.

По актуальности темы исследования, степени обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, их достоверности, новизне, научно-теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Боголюбовой Ирины Олеговны «Структурно-функциональная организация ядра в период активации эмбрионального генома мыши» полностью удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (ред. от 28.08.2017), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Кузнецова Татьяна Владимировна
доктор биологических наук
по специальности 03.00.15 – Генетика,
доцент по специальности "Генетика",
ведущий научный сотрудник отдела геномной медицины
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии им.Д.О.Отта»
(ФГБНУ «НИИАГиР им.Д.О.Отта»)
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3
+7 (812) 328-02-62; м 328-98-09
tkuznetzova@mail.ru



Подпись Т.В.Кузнецовой заверяю:

Ученый секретарь
ФГБНУ «НИИАГиР им.Д.О.Отта»
К.М.Н.



Р.В.Капустин

16.04.19