

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук

Боголюбовой Ирины Олеговны на тему

«Структурно-функциональная организация ядра в период активации эмбрионального генома мыши»

по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация Боголюбовой И.О. посвящена исследованию структурно-функциональной организации ядер эмбрионов млекопитающих на ранних стадиях развития. Данное направление исследования выбрано не случайно: именно на этой стадии происходят ключевые события, определяющие не только дальнейшее функционирование генома, но и все клеточные процессы, приводящие, в конечном итоге, к формированию из единственной оплодотворенной яйцеклетки сложного многоклеточного организма. Именно в этот момент формируются *de novo* специфические ядерные структуры, обеспечивающие и отражающие динамику реактивации родительских геномов, и именно в этот момент процесс их естественного зарождения и следует исследовать. К сожалению, именно ранние стадии онтогенеза млекопитающих являются наиболее технически сложными для изучения, требующими разработки специфических методических подходов. Поэтому исследование И.О.Боголюбовой имеет особую ценность.

Диссертация Боголюбовой И.О. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения. Диссертация изложена на 256 страницах, список цитируемой литературы содержит 564 именования.

В разделе «Обзор литературы» содержится подробная сводка современных данных о структурно-функциональной организации интерфазного ядра, с акцентом на нехроматиновые ядерные домены, что вполне логично в связи с основной идеей данного исследования. Отдельный раздел посвящен детальному анализу особенности регуляции генной активности в процессе активации генома в эмбриогенезе мыши, поскольку именно этот организм являлся модельным для проведения изложенных в диссертации исследований. Объем информации, представленный в обзоре литературы, продуманно дозирован, чтобы дать полное представление о существующем на сегодняшний день состоянии науки в данной области, но не вызвать у читателя отторжения по причине обилия специфических деталей.

Обзор литературы изложен прекрасным стилем, легко читается и вызывает самые положительные впечатления.

Раздел «Материалы и методы» содержит сведения об использованных в работе экспериментальных моделях и аналитических процедурах. В работе использовался широкий спектр современных методических подходов, от традиционных методов микроскопии - как иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии (в том числе, иммуноэлектронной), так и методов анализа молекулярных взаимодействий при помощи FRET, до биохимического анализа и микроинъекций зондов и предшественников, что демонстрирует хорошую методическую подготовку диссертанта. Принимая во внимание особенности исследуемого объекта, следует особо подчеркнуть трудоемкость проведенных исследований. К недостаткам данного раздела я могу отнести лишь недостаточно подробное описание методов анализа изображений, что в дальнейшем скажется на понимании некоторых результатов. Также для данного типа исследований представляется важным указывать использованный размер конфокальной диафрагмы.

Раздел «Результаты и обсуждение» содержит подробное описание полученных данных по вопросу о процессах реорганизации ядерных доменов в раннем эмбриогенезе мыши. Группировка результатов и обсуждения по отдельным главам, посвященным исследованию кластеров интерхроматиновых гранул, телец Кахала и, в меньшей степени, проядрышек, в нормальном развитии, в состоянии «двухклеточного блока *in vitro*», а также особенностей организации актина в ранних эмбрионах мыши, мне представляется оправданной, поскольку позволяет читателю легче сконцентрироваться на ключевых моментах исследуемых объектов и явлений. Особый интерес автора сконцентрирован на особенностях формирования ядерных доменов, благо ранний эмбриогенез представляют собой оптимальный модельный объект, для которого характерен переход от неактивного состояния генома к полностью функциональному, что сопровождается *de novo* формированием многих ядерных структур. Автором были подробно прослежены ключевые этапы формирования кластеров интерхроматиновых гранул и телец Кахала, а также исследована роль активации транскрипции в этих процессах. Было показано, что по многим критериям, динамика нехроматиновых доменов ядра в эмбрионах существенно отличается от таковой в соматических клетках, а также от эмбрионов в состоянии двухклеточного блока. Отдельный интерес, на мой взгляд, представляют наблюдения о гетерогенном эпигенетическом статусе периферического хроматина проядрышек, в том числе с точки

зрения пространственной организации генома и ее динамики в эмбриогенезе. Эта тема заслуживает дальнейшего исследования.

Небольшое замечание касается роли кластеров интерхроматиновых гранул в транспорте мРНК. Мне кажется, что статические эксперименты по колокализации компонентов hnРНК с КИГ в данном случае не являются достаточно информативными.

Раздел, посвященный организации актина в ядрах ранних эмбрионов мыши, вызвал у меня наиболее противоречивые чувства. С одной стороны, данная тема давно является предметом дискуссий и настоятельно требует разрешения, поэтому усилия автора прояснить ситуацию заслуживают всяческого поощрения. С другой стороны, мне кажется, что часть выбранных автором экспериментальных подходов для данного исследования не полностью соответствуют поставленной задаче. Например, мне кажется дискуссионным использование ДНказы I в качестве зонда на актин, особенно в формате флуоресцентной микроскопии и без использования проверенных положительных контролей. Далее, я испытал определенные сложности с интерпретацией данных FRET-анализа. По данным автора, наибольшая эффективность FRET наблюдается, как ни странно, в областях клетки с наименьшей интенсивностью флуоресценции. Принимая во внимание достаточно низкую эффективность резонансного переноса энергии в целом, это достаточно неожиданно, если только не учитывать возможность фальшивых позитивных результатов в области фона. К сожалению, автор не приводит деталей измерения FRET, кроме известной формулы, а также не представляет положительных контролей. Также хотелось бы более подробного описания методов анализа колокализации актина с сайтами транскрипции, о чем уже сказано выше. Хотелось бы видеть результаты количественного анализа колокализации. Тем не менее, данные иммунофлуоресцентного анализа выглядят вполне убедительными, указывая на несомненное присутствие актина, предпочтительно в олигомерной или глобулярной форме, в различных ядерных компартментах, хотя функциональное его значение остается до конца не выясненным.

К общим замечаниям следует отнести использование слишком мелкого шрифта для обозначений на некоторых микрофотографиях. Также в подписях к некоторым рисункам отсутствуют обозначения элементов монтажа, их можно найти только в тексте раздела.

Тем не менее, указанные недочеты не оказывают существенного влияния на общую положительную оценку представленной диссертации, содержащей важные сведения о процессах формирования ядерных доменов в раннем эмбриогенезе. Выводы из работы вполне обоснованы и содержат ряд важных положений, имеющих большое значение для

клеточной биологии и биологии развития. Результаты диссертации опубликованы в 42 работах, включая 1 главу в коллективной иностранной монографии, 19 статей в журналах, входящих в список ВАК или в международные базы данных Web of Science и Scopus, 3 статьи в сборниках, 19 тезисов докладов, представленных на международных и российских конференциях и симпозиумах. Автореферат соответствует тексту диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Боголюбовой Ирины Олеговны «Структурно-функциональная организация ядра в период активации эмбрионального генома мыши» полностью удовлетворяет требованиям пп. 9—14 «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.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
заведующий отделом электронной микроскопии
НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова



Киреев Игорь Игоревич

23.04.2019

Контактные данные:

тел.: 7(495)9395528; e-mail: kireev@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Адрес места работы:

119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1, стр.40

МГУ имени М.В.Ломоносова,

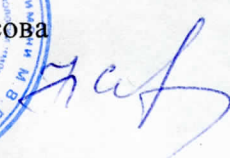
НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского

Тел.: 7(495)9395528; e-mail: kireev@genebee.msu.ru

Подпись сотрудника НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова
Киреева И.И. удостоверяю

Зав. канцелярией

НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова



Н.Н.Сидорова

23.04.2019