

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию **Боголюбовой Ирины Олеговны**

на тему: «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 избранной темы

Изучение процессов, сопровождающих раннее (доимплантационное) развитие млекопитающих, а также механизмов их регуляции традиционно относится к одному из наиболее актуальных направлений биологии развития, имеющих огромное фундаментальное и практическое значение. Разработка репродуктивных технологий, включая методы экстракорпорального оплодотворения и культивирования зародышей *in vitro*, 40 лет назад привели к рождению первого «ребенка из пробирки», за что их автор - профессор Роберт Эдвардс в 2010 г был удостоен Нобелевской премии по медицине. С тех пор представления о закономерностях и механизмах раннего эмбрионального развития человека значительно расширились. Однако по морально-этическим причинам, ограничивающим использование зародышей человека, основным модельным объектом исследований эмбриогенеза у млекопитающих являются лабораторные мыши. Зародышей лабораторных мышей активно используют для решения самого широкого круга задач, несмотря на различия между мышью и другими млекопитающими по времени активации эмбриональных генов (АЭГ, суммированы автором в Таблице 2, стр. 56). В связи с этим, **цель диссертационной работы И.О. Боголюбовой** - анализ динамики структурно-функциональной организации клеточного ядра в эмбрионах мыши в период АЭГ - представляется оправданной и актуальной.

В работе автор решал несколько конкретных задач:

1. Изучение морфологических особенностей и молекулярного состава кластеров интерхроматиновых гранул (КИГ) и коилинсодержащих телец в ядрах эмбрионов мыши на начальных этапах дробления.
2. Анализ молекулярного состава проядрышек и ассоциированного с ними гетерохроматина в ядрах доимплантационных эмбрионов мыши методами иммуноцитохимии.
3. Сравнительный анализ структурной организации ядра и внутриядерного распределения ключевых факторов метаболизма мРНК в зародышах мыши, обладающих различным транскрипционным статусом.

4. Выявление особенностей структурно-функциональной организации клеточного ядра эмбрионов мыши в состоянии «2-х клеточного блока *in vitro*». 5. Сравнительный анализ распределения ядерного актина и его возможную ассоциацию с универсальными ядерными доменами и компонентами посттранскрипционного метаболизма мРНК в эмбрионах мыши с разным транскрипционным статусом.

Для решения этих задач И.О. Боголюбова использовала широкий арсенал методов, из которых основным являлся иммуноцитохимический анализ распределения и колокализации в зародышах ключевых маркеров ядерного метаболизма соматических клеток. К ним относятся факторы транскрипции (РНК полимеразы I и II), факторы сплайсинга и транспорта мРНК, ядерный актин и другие регуляторные белки (всего – более 20 белков). В совокупности, эти белковые маркеры позволяют выявлять все ядерные домены, характерные для зародышей: кластеры интерхроматиновых гранул, проядрышки, ассоциированный с проядрышками гетерохроматин и коилинсодержащие тельца. Большим достоинством работы является сочетание метода иммунофлуоресценции с электронной микроскопией, проведенное для большинства экспериментальных воздействий. В настоящее время число работ, выполненных с использованием электронной микроскопии на зародышах млекопитающих, является весьма скромным, несмотря на ее очевидные преимущества в разрешающей способности по сравнению со световой микроскопией. Нельзя не отметить также усилия автора применить метод FRET (fluorescence resonance energy transfer) для выявления возможных взаимодействий между несколькими ядерными белками. На сегодняшний день метод FRET практически не используется при работе с зародышами, прежде всего, из-за отсутствия четких методических рекомендаций. И.О. Боголюбовой, по крайней мере, частично удалось заполнить этот пробел. Кроме того, в работе были использованы такие традиционные методы анализа зародышей как микроинъекции предшественников синтеза РНК, обработка зародышей ингибиторами транскрипции и процессинга РНК (актиномицином Д и DRB, соответственно), а также иммуноблотирование. В соответствии с современными требованиями, результаты были статистически обработаны.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Не вызывает сомнения, что рецензируемая работа представляет собой многоплановое и объемное исследование, которое значительно расширяет существующие представления о структурно-функциональной организации ядер ранних зародышей млекопитающих при неактивном состоянии (зигота) и по мере активации эмбриональных генов. В частности, И.О. Боголюбовой, впервые описаны морфологические, функциональные и иммуноцитохимические признаки основных ядерных доменов у зародышей мыши при

естественной и индуцированной остановке раннего развития, а также проведен глубокий анализ распределения глобулярного (G-) и фибриллярного (F-) актина с помощью нескольких подходов. Хочу особо отметить, что автором выявлен новый иммуноцитохимический маркер зародышевых проядрышек – фактор экспорта мРНК Aly (рис. 60г), что указывает на возможное участие проядрышек в созревании мРНК. Впервые выявлены также маркеры гетерохроматина, ассоциированного с проядрышками, а именно, компоненты экзонного комплекса Y14 и NXF1/TAP, что свидетельствует о вовлеченности «околоядрышкового» гетерохроматина в процессинг мРНК. Описаны функциональные перестройки интерхроматиновых гранул и коилин-позитивных структур. Не вызывает сомнения, что полученные результаты будут полезны для исследований функциональной организации ядер в зародышах млекопитающих других видов, включая человека.

Объем, структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертационная работа написана по традиционному плану и изложена на 256 страницах машинописного текста. Диссертация включает список использованных сокращений и традиционные разделы: «Введение» (11 стр.), «Обзор литературы» (55 стр.), «Материалы и методика» (14 стр.), «Результаты и обсуждение» (100 стр.), «Заключение». (7 стр.), а также выводы, список основных публикаций по теме работы и список литературы (содержит 564 ссылки на первоисточники, из которых 546 – на английском языке). Диссертация проиллюстрирована 62 рисунками высокого качества (схемы, гистограммы, электронно-микроскопические и светооптические микрофотографии, объединенные в монтажи). Рисунки в диссертации имеют сплошную нумерацию; к разделу «Обзор литературы» относится 10 рис., к разделу «Результаты и обсуждение» – 51, кроме того 1 оригинальная схема, обобщающая основные тенденции структурных перестроек ядер в раннем эмбриогенезе мыши приведена в разделе «Заключение». Безусловным достоинством работы является наличие 8 таблиц, обобщающих свойства использованных антител и основные полученные результаты, что облегчает усвоение излагаемых сведений.

Раздел «Введение» к диссертации содержит все необходимые подразделы. В частности, здесь И.О. Боголюбова в полном объеме обосновывает целесообразность выполнения исследования и его актуальность, а также его цель и задачи работы. Замечаний по данному разделу у меня нет.

В разделе «Обзор литературы» автор исчерпывающе излагает данные о структурно-функциональной организации ядер соматических клеток и прекрасно описывает свойства и функции основных ядерных доменов у млекопитающих. Затем И.О. Боголюбова подробно

описывает особенности ядерной организации у зародышей в сравнении с соматическими клетками. Не вызывает сомнения, что автором проделана колоссальная работа по сбору и анализу литературы по теме диссертации. Обзор литературы великолепно написан, читается с большим интересом и, как мне представляется, может быть опубликован в виде нескольких обзоров или отдельной монографии.

Раздел «Материалы и методика», в целом, содержит всю необходимую информацию для оценки адекватности использованных объектов и подходов.

Основной содержательной частью диссертации является раздел «Результаты и обсуждение», который в свою очередь делится на несколько подразделов (Структурно-функциональная организация ядер при активации эмбрионального генома в контроле, Структурно-функциональная организация ядер при «двухклеточном блоке *in vitro*»; самостоятельный – третий - подраздел посвящен выявлению актина в ранних зародышах). Каждый из этих подразделов содержит обсуждение полученных результатов. Итоговые обобщения объединены в разделе «Заключение», что представляется вполне оправданным с учетом большого объема полученных экспериментальных данных.

Диссертация написана хорошим литературным языком и легко читается. Не вызывает никакого сомнения, что И.О. Боголюбова является экспертом в выбранной области исследования и внесла значимый вклад в ее развитие.

Критические замечания и вопросы к дискуссии.

По работе у меня возникли скорее вопросы, чем замечания.

1. К использованной терминологии. На стр. 134 диссертации автор справедливо отмечает, что для телец, которые образуются в зародышах всех млекопитающих вместо нормальных (трехкомпонентных) ядрышек, существует несколько наименований. В современной англоязычной литературе эти тельца называют «nucleolus precursor bodies, или NPBs». Наиболее удачным русскоязычным переводом этого названия автор считает термин «проядрышки». Однако использование термина «проядрышки», хотя и не мешает пониманию полученных результатов, не представляется мне удачным по следующей причине. На сегодняшний день «проядрышками» (англ. – *prenucleolar bodies*) называют тельца, которые образуются в ядрах соматических клеток в конце митоза и которые резко отличаются от эмбриональных NPBs по многим признакам. Так, истинные (митотические) проядрышки имеют иную ультраструктуру, существуют в течение сравнительно короткого (примерно 1-2 ч) отрезка времени, не содержат рДНК, не способны к транскрипции, а их материал утилизируется для построения пост-митотических ядрышек за счет слияния телец с активированными ядрышковыми организаторами (локусами рДНК) (см., например, обзор

Hernandez-Verdun D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. // *Nucleus*. 2011. 2: 189-194). Все эти признаки отсутствуют у эмбриональных NPBs. Поэтому я полагаю, что для обозначения NPBs лучше использовать другое название, например, «предшественники ядрышка» (ПЯ), которое отражает их основную роль в эмбриональном нуклеологенезе. Хотя функции предшественников ядрышек до сих пор остаются неизвестными, доказано, что они связаны с рДНК и преобразуются в функциональные ядрышки при возобновлении транскрипции зародышевых рибосомных генов.

2. Не понятно, чем была вызвана столь длительная фиксации зародышей для иммунофлуоресценции: 40—60 мин при комнатной температуре в 4 %-ном, а затем не менее 12 ч в 2% параформальдегиде (ПФА) (стр. 76). Обычно для этих целей зародыши фиксируют 2-4%-ным ПФА не более 1 часа (например, Fulka H, Langerova A. The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition.// *Development*. 2014. 141: 1694-1704). Из практики известно также, что увеличение времени фиксации препятствует пермеабиллизации клеток детергентом (Тритоном X-100) и в результате снижает доступность антител к внутриклеточным антигенам.

3. Для иммунофлуоресцентного мечения были использованы два способа получения зародышей – давленные препараты (стр. 75) и тотальные препараты (стр. 76). Однако насколько совпадают результаты, полученные разными методами при постановке иммуноцитохимических реакций, не обсуждается. Мне кажется, что в подписях к рисункам было бы полезно отметить способ получения зародышей для оценки возможных различий в расположении антигенов.

4. Не указано, сколько зародышей было использовано для лизирования при постановке иммуноблотов (стр. 82), хотя этот вопрос имеет принципиальное значение для экономного использования животных. Осталось непонятным, какие еще антитела, кроме антител к актину (рис. 48), были проверены на специфичность. В частности, осталось неясным, насколько специфичны антитела к РНК полимеразе I – типичному ядрышковому белку, который, тем не менее, в значимых количествах выявлялся в нуклеоплазме двухклеточных зародышей и особенно зародышей на стадии морулы, где формирование активных ядрышек практически завершено (рис. 26, стр. 105).

5. Несколько вопросов касается интерпретации результатов, полученных методом FRET. Во-первых, в соответствии с представленными изображениями в тексте автор справедливо отмечает, что проядрышки не окрашивались на актин ни одним из использованных способов. Так, актин не выявлялся в проядрышках при использовании ДНКазы I-Alexa 488 (рис. 36, текст на стр. 159: «для большинства зародышей было характерно заметное флуоресцентное мечение всего объема ядер (за исключением мест локализации проядрышек»)), фаллоидином-

TRITC (рис. 47) и при иммуномечении специфическими антителами (рис. 49, заключение на стр. 162: «проядрышки остаются практически неокрашенными»). С другой стороны, при отображении эффективности FRET в псевдоцветах (Синий-Зеленый-Красный) синие сигналы обычно указывают на отсутствие межбелковых взаимодействий (Kardash E, Bandemer J, Raz E. Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. Nat Protoc. 2011. 6: 1835-1846). Кроме того, интерпретация результатов FRET требует использования позитивного контроля, т.е. FRET-пары для которой межбелковые взаимодействия являются доказанными. Отсутствие FRET-сигнала (т.е., негативный FRET) нуждается в нескольких дополнительных контролях. В связи с этим, заключение автора о позитивном FRET в ядрах и проядрышках, указывающий на пространственные взаимодействия NXF1/TAP—актина, Y14—актина и Aly-актина, мне представляется важным, но небесспорным.

Заключение

В заключение хочу отметить, что заданные вопросы не снижают общей высокой оценки рецензируемой работы. У меня нет сомнения, что диссертация И.О. Боголюбовой на тему «Структурно-функциональная организация ядра в период активации эмбрионального генома мыши» является законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием, которое направлено на решение актуальной научной проблемы - выяснение структурных и иммуноцитохимических особенностей ядер ранних зародышей млекопитающих (на примере мыши) при активации эмбрионального генома. В результате проведенного исследования И.О. Боголюбовой разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области клеточной биологии и биологии развития, расширяющее представления о закономерностях компартментализации ядра на фоне активации эмбриональных генов.

Результаты работы полно освещены в 42 публикациях, включая одну 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 написан четко, целиком соответствует тексту диссертации и дает полное представление об объеме, всех этапах экспериментальной работы, полученных результатах и выводах.

Содержание диссертации И.О. Боголюбовой соответствует паспорту специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология» (по биологическим наукам).

Таким образом, по актуальности темы исследования, степени обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, их достоверности, новизне, научно-теоретической и практической значимости полученных результатов, а также высокому качеству изложения материала 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 искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор

Зацепина
Зацепина Ольга Владимировна

Должность и место работы: Главный научный сотрудник с выполнением обязанностей руководителя Лаборатории функциональной организации клеточного ядра Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ РАН).

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация: 03.00.17 – цитология.

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 779-23-66; E-mail: zatsepina_olga@mail.ru (О.В. Зацепина)

Адрес места работы: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, ИБХ РАН.

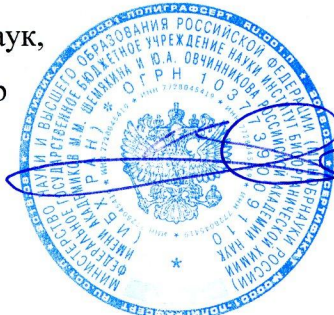
Тел.: +7 (495) 335-01-00. Факс: +7 (495) 335-08-12.

Сайт Института: www.ibch.ru

Подпись д.б.н., профессора О.В. Зацепиной заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Д. ф.-м. наук, профессор

30 апреля 2019 г



В.А. Олейников