

Отзыв
на автореферат диссертации И.О. Боголюбовой «Структурно-функциональная организация ядра в период активации эмбрионального генома мыши», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Изучение структурно-функциональной организации клеточного ядра на протяжении долгого времени было и остается важнейшим направлением исследований клеточной биологии. Важность таких исследований объясняется тем, что пространственная организация и состав ядерных доменов прямо влияет на осуществление и регуляцию всех этапов экспрессии генома, а также связана с патогенезом ряда злокачественных заболеваний человека. Подавляющее число работ в данной области проведено с использованием соматических клеток млекопитающих или их клеточных культур. Однако для выявления универсальных закономерностей ядерной компартментализации необходимо максимально возможное расширение спектра модельных объектов.

Исследования И.О.Боголюбовой в диссертационной работе проведены на сложном и интересном объекте - ранних эмбрионах мыши в период активации эмбрионального генома. Эмбрионы на стадии дробления являются перспективными моделями не только для изучения различных аспектов структуры и функций клеточного ядра, но и для анализа многих ключевых вопросов клеточной биологии, включая механизмы полипотентности и дифференцировки клеток.

Для анализа изменений структурно-функциональной организации клеточного ядра эмбрионов мыши в период активации эмбрионального генома И.О.Боголюбова использовала как традиционные, так и современные методы изучения биологии клетки - иммунофлуоресцентное мечение с использованием конфокальной микроскопии, колокализацию молекул с помощью FRET-анализа, просвечивающую электронную микроскопию и электронную микроскопию с использованием иммуноколлоидного золота, получение эмбрионов, внутриклеточные микроинъекции и другие.

В работе И.О. Боголюбовой проведен комплексный анализ функциональной морфологии клеточных ядер на ранних стадиях дробления эмбрионов мыши и выявлены принципиальные различия между структурой ядер транскрипционно инертных эмбрионов: до начала активации эмбрионального генома (АЭГ), после использования ингибиторов транскрипции на транскрипционно активной (поздней двухклеточной) стадии и в блоке развития *in vitro*. Проведен детальный анализ структуры и состава следующих ядерных структур: проядрышки, ассоциированный с проядрышками хроматин и гетерохроматин, кластеры интерхроматиновых гранул (КИГ, ядерные спектры), тельца Кахаля (ТК), тельца гистоновых локусов (ТГЛ). Кроме того, было проведено иммуноцитохимическое исследование внутриядерного распределения актина в ранних эмбрионах мыши в период АЭГ с целью выяснить преимущественную форму актина в ядрах эмбрионов мыши, а также выявить возможную ассоциацию актина с различными ядерными структурами.

В работе получено большое количество важных и уникальных данных. Впервые продемонстрирована гетерогенность популяции коилинсодержащих телец в период АЭГ как по морфологическим характеристикам, так и по молекулярному составу. Показано присутствие актина и шаперона нуклеиновых кислот YB-1 в отдельных коилин-позитивных структурах. Впервые продемонстрирована полифункциональность кластеров интерхроматиновых гранул (КИГ) и их возможное участие в процессах посттранскрипционного метаболизма мРНК. Показано, что постепенное формирование КИГ происходит в ходе начальных этапов дробления, выявлены основные

тенденции динамики морфологии и молекулярного состава этих ядерных доменов в ходе реализации АЭГ.

В главах, посвященных изучению проядрышек, приведены новые факты, указывающие на возможную полифункциональность проядрышек в эмбрионах мыши. Впервые в составе этих структур обнаружены некоторые компоненты комплекса связи экзонов. В составе транскрипционно инертного гетерохроматина, ассоциированного с проядрышками, обнаружены эпигенетические метки как репрессированного, так и активного хроматина (H3me3K9 и H4acK5, соответственно). Мне также представляются интересными и важными данные, представленные в таблице 1 автореферата, в которой с помощью непрямого иммунофлуоресцентного мечения и использования антител к 8 различным антигенам показано, что молекулярный состав ассоциированного с проядрышками гетерохроматина изменяется в ходе реализации АЭГ, а также при искусственном подавлении транскрипционной активности. На ранних, транскрипционно неактивных стадиях в составе хроматина, ассоциированного с проядрышками, были выявлены некоторые факторы метаболизма мРНК (факторы SC35 и транскрипции TFIID), а на поздних стадиях развития выявляются другие ядерные белки (EJC - Y14, хроматинре моделирующий белок ATRX, белок Daхх). Таким образом, молекулярный состав гетерохроматина, ассоциированного с разными проядрышками, может быть различен. В автореферате И.О.Боголюбова отмечает, что ассоциированный с проядрышками гетерохроматин в 1—2-клеточных эмбрионах мыши имеет своеобразный молекулярный состав, отличный от такового периферического гетерохроматина. Поэтому мне кажется, что табл.1 выиграла бы, если в нее добавить колонку по данным периферического гетерохроматина для непосредственного сравнения данных.

Полученные в работе данные позволили И.О.Боголюбовой сделать важный вывод о том, что комплекс проядрышка с окружающим его гетерохроматином можно рассматривать как мультифункциональный провизорный домен ранних эмбрионов на стадии активации эмбрионального генома, оба компонента которого во многом функционируют как единое целое.

В исследованиях структурно-функциональной организации ядер эмбрионов мыши при остановке развития *in vitro* с использованием конфокальной и электронной микроскопии И.О.Боголюбовой обнаружено, что при сохранении своей ультраструктурной организации ядра заблокированных эмбрионов характеризуются значительным перераспределением ряда ключевых факторов транскрипции и сплайсинга мРНК.

Большое внимание в диссертации уделено сравнительному анализу распределения ядерного актина, его ассоциации с универсальными ядерными доменами и возможного пространственного взаимодействия с компонентами посттранскрипционного метаболизма мРНК в эмбрионах мыши с различным транскрипционным статусом. Для выявления мономерного актина И.О.Боголюбова использовала ДНКазу I-Alexa488, фибриллярный актин выявляли с помощью TRITC-фаллоидина. Также были использованы два вида коммерческих антител к С- и N-концевым фрагментам молекулы актина и показано, что паттерны внутриядерного распределения актина при их использовании различаются. Показано, что фибриллярный актин в ядрах нормально развивающихся эмбрионов отсутствует, однако при искусственном подавлении транскрипции происходит его накопление в проядрышках. Актин в ядрах ранних эмбрионов мыши присутствует преимущественно в олигомерной форме и локализуется как в сайтах РНК-полимеразы II-зависимой транскрипции, так и в зонах гетерохроматина, а также непосредственно вовлечен в процессы экспорта мРНК.

На основе полученных данных И.О.Боголюбовой разработана модель поэтапного формирования дефинитивной структуры клеточного ядра в период АЭГ, выделены общие и специфические особенности структурной организации ядер в раннем эмбриогенезе млекопитающих, которые в наглядной форме представлены в схеме, описывающей

основные тенденции структурно-функциональных перестроек ядер ранних эмбрионов мыши (рис. 16 автореферата).

Таким образом, в диссертационной работе И.О. Боголюбовой проведены исследования по решению крупной научной задачи, посвященной характеристике преобразований структурно-функциональной организации клеточного ядра в период активации эмбрионального генома. Полученные данные имеют большое теоретическое значение, а также важны для решения практических задач, в которых требуется иметь объективные критерии оценки качества эмбрионального материала. Все описанные в работе экспериментальные результаты были получены лично И.О.Боголюбовой, ей принадлежит ведущая роль в выборе направлений исследования, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке материалов к публикации. По материалам диссертации опубликовано 42 работы (из них 1 глава в коллективной 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).

Считаю, что диссертационная работа И.О.Боголюбовой «Структурно-функциональная организация ядра в период активации эмбрионального генома мыши» соответствует всем требованиям ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор — И.О.Боголюбова - безусловно заслуживает присуждения искомой степени доктора наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Доктор биологических наук
(03.00.03 - Молекулярная биология)

Попенко В.И.

Ведущий научный сотрудник
Лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Институт молекулярной биологии им.
В.А.Энгельгардта Российской академии наук,
доктор биологических наук (03.00.03. - «Молекулярная
биология»)

Попенко Владимир Иванович
Москва, 119991, ул. Вавилова, 32
e-mail: popenko@eimb.ru
Тел: +7-499-1359804

Подпись В.И. Попенко одобряю
Учредитель секретарь ИМБ РАН
Бочаров А.А.

