

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора А.В. РОДИОНОВА на диссертацию Артема Михайловича КИСЕЛЕВА «Состав ядерных доменов и динамика слитного белка Y14-Мус в ооцитах жука *Tribolium castaneum*», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Диссертационная работа А.М. Киселева посвящена актуальной для клеточной биологии теме - исследованию функциональной морфологии ядра в оогенезе. Следует подчеркнуть, что объект исследования - жуки-чернотелки вида *Tribolium castaneum* - одна из новых моделей в современной биологии развития и геномике, детали оогенеза которой изучены на сегодняшний день лишь фрагментарно.

Автор диссертации поставил перед собой интересные, вполне обоснованные задачи:

1. Исследовать морфологию и динамику внутриядерных структур в растущих ооцитах *Tribolium*.
2. Развить методику культивирования ооцитов *Tribolium* in vitro.
3. С помощью методов иммуноцитохимии идентифицировать среди внутриядерных структур в ядрах ооцитов *Tribolium* структуры, соответствующие ранее описанным на других объектах тельцам Кохала и кластерам интерхроматиновых гранул.
4. Изучить строение и молекулярную организацию до сих пор остающейся малоисследованной структуры, называемой капсулой кариосферы.
5. Изучить ассоциацию одного из факторов сплайсинга белка Y14 с ядерными структурами белка-чернотелки.

Еще раз подчеркнем то важное обстоятельство, что объект исследования диссертанта - новая модель для биологии развития и геномики, что кажется нам существенным достоинством работы.

Диссертационная работа Артема Михайловича Киселева построена по традиционному плану, т.е. состоит из разделов Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Список литературы, Приложение (дополнительные материалы).

Введение к диссертации написано просто и ясно. Видно, что диссертант хорошо понимает суть работы и ясно понимает цели и задачи исследования.

В обзоре литературы дается подробное и интересное описание особенностей оогенеза объекта исследований, жука-чернотелки. Этот раздел обзора литературы не вызывает замечаний - он достаточно подробен и иллюстрирован. Затем рассказывается о двух типах внутриклеточных тельцах, описанных в ядрах эукариот, таких как тельца Кохала и кластеры интерхроматиновых гранул, о их молекулярной организации и возможных функциях. Далее дается вполне квалифицированное описание строения и обсуждение функций кариосферы. И, наконец, раздел 2.4. посвящен белку Y14, как составной части комплексов сплайсинга. Этот раздел, как и предыдущие, написан просто и ясно - видно, что автор хорошо владеет языком и умеет рассказать о предмете. Однако именно к этому разделу обзора литературы у меня наиболее серьезная претензия. Я вполне согласен с диссертантом, когда он на странице 30 пишет, что «за последние годы биохимические и структурные исследования привели к лучшему пониманию механизмов, связанных со сборкой, функционированием и утилизацией комплекса связи экзонов» (это один элементов механизма сплайсинга). Однако, если мы посмотрим на источники, которыми оперирует диссертант в этой части обзора, то окажется, что во всей главе 2.4 среди всех упоминаемых литературных источников нет работ 2012-2014 гг, лишь одна статья опубликована в 2011 году (Kataoka et al., 2011), вскользь, среди прочих, упоминаются одна работа 2008 г. (Ma et al., 2008) и две 2007 г. (Giorgi, Moore, 2007; Diem et al., 2007). Все остальные источники (а их не мало) опубликованы 10 и более лет назад, в то время как в главе 2.4 речь идет о механизмах сплайсинга, интенсивно изучаемых и обсуждаемых в настоящее время.

Раздел «Материалы и методы» написан на хорошем, профессиональном уровне. Он показывает, каким широким арсеналом методов современной клеточной биологии владеет диссертант. Это и методы работы с живой культурой булавоусого хрущака, и методы культивирования ооцитов, широкий спектр методов молекулярной биологии, включающих работу с ДНК, с РНК, с белками. Кроме этого, в работе использовались

методы биоинформатики, методы флуоресцентной микроскопии, иммуноцитохимии, метод иммуноэлектронной микроскопии. Из этого следует существенный для квалификационной работы вывод: диссертант - вполне подготовленный в техническом отношении специалист в области клеточной биологии.

Раздел «Результаты».

Глава 4.1, озаглавленная «Динамика ядерных структур ооцитов *Tribolium castaneum*. Кариосифера и ее капсула» имеет большое значение для всей работы, поскольку именно в ней впервые дается описание процесса оогенеза у нового объекта клеточной биологии и сравнительной геномики. В таблице 3 (стр. 45) дается описание стадий развития ооцита *T. castaneum*, особое внимание при этом уделяется состоянию хромосом в ядре. Описание наблюдаемых процессов составлено ясно и профессионально, но надо отметить, что многое из описанного читателю приходится принимать на веру, так как приведенные на микрофотографиях (стр. 44, рис. 3) мы видим только выделенные ядра, причем это ядра раздавленные, наблюдаемые методом фазового контраста в сочетании, по-видимому, с окрашиванием ДАПИ (в подписи под рисунком детали получения наблюдаемых картин не описаны). Выбранный метод наблюдения и сами фотографии, к сожалению, малоинформативны, многое остается за кадром, о многом приходится только догадываться. Из фотографии 4-II, например, совсем не следует, что на данной стадии деконденсированные хромосомы занимают все пространство ядра (если ориентироваться на фотографию, приведенную в автореферате, а не в диссертации - в последней качество этой фотографии хуже). Остается неясным, что это за два шаровидных ДАПИ-негативных крупных тела, которые мы видим на этой фотографии. Вообще, раз уж приведены на фотографиях только ядра, надо было обозначить на них, какие внутриядерные тела мы видим в каждом из ядер. Где здесь кариосфера, и что это за шары разного размера в кариоплазме?

Качество и информативность микрофотографий, иллюстрирующих этап исследования ядерных телец в ядрах ооцитов *Tribolium castaneum* (раздел 4.2) значительно выше. Это, конечно, очень сильная и информативная часть работы, в которой показана природа телец, называемых диссертантом тельцами 1 и 2-го типа. Однако и к этому разделу есть замечание: осталось совершенно непонятным, как выглядят и что представляют из себя

тельца 3-го типа, которые не отмечены ни на одной из микрофотографий и о которых мы знаем только, что их диаметр 3-5 мкм (стр. 50).

Очень интересные результаты изложены в разделах работы, посвященных изучению транскрипционной активности хромосом, собранных в кариосферу и изучению компонентов кариосферы. Важно, что диссертанту с помощью нескольких технически сложных и современных методов клеточной биологии впервые удалось доказать, что на стадии кариосферы в перихроматиновой области происходит транскрипция.

Последний раздел работы посвящен исследованию положения в клетке фактора сплайсинга белка Y14, для чего диссертантом была сконструирована ген слитного белка Y14-Мус под промотором Т7. Показана экспрессия этой конструкции в клетках человека и жука. С помощью методов электронной иммуногистохимии диссертант показал присутствие слитного белка Y14-Мус в SC35-содержащих тельцах ооцитов жука-чернотелки на V стадии оогенеза. При этом на стадии сформированной капсулы кариосферы метка, сигнализирующая о белке Y14, располагалась в фибриллярной зоне капсулы кариосферы.

Полученные результаты квалифицировано, подробно, с надлежащей степенью детальности обсуждены.

Научная новизна работы многих аспектов представленной к защите работы А.М. Киселева не вызывает никаких сомнений. В диссертации впервые дано описание оогенеза одного из модельных объектов сравнительной геномики жука-чернотелки *Tribolium castaneum*, выполненное с особым вниманием на поведение хромосом и организацию внутриядерных компартментов в ядрах ооцитов, таких как кариосфера, капсула кариосферы, несколько типов экстрахромосомных ядерных телец. Впервые показано, что хромосомы развивающегося ооцита *T. castaneum* на стадии диплотены профазы I мейоза рано объединяются в компактную кариосферу, которая, в отличие от кариосферы близкого представителя того же семейства *Tenebrio molitor*, имеет развитую капсулу. Впервые установлено, что часть ДНК хромосом, объединенных в кариосферу, обладающую внешней капсулой, продолжает транскрибироваться до поздних стадий роста ооцита включительно. Впервые методами иммуноцитохимии изучен химический состав капсулы кариосферы жука-чернотелки и показано, что капсула кариосферы содержит белки ядерного матрикса (актин и ламин В), она обогащена РНК, включая 5'-триметилгуанозин-

кэпированные мРНК. Впервые продемонстрировано, что в состав капсулы кариосферы входит фактор сплайсинга Y14.

Теоретическое и практическое значение работы несомненно. Работа имеет фундаментальный характер, разрабатываемые в ней проблемы имеют большое значение для развития общих вопросов биологии развития и клеточной биологии. Полученные диссертантом результаты значительно расширяют представления о структурно-функциональной компартментализации ядра ооцита Членистоногих и, в частности, дают новую и важную информацию о молекулярном составе внутриядерных доменов ооцитов насекомых.

Материалы работы неоднократно обсуждались на всероссийских симпозиумах, они опубликованы в трех статьях в уважаемых реферируемых журналах и потому хорошо известны специалистам.

Автореферат диссертации объективно и достаточно подробно отражает ее содержание.

В работе А.М. Киселева получены новые фундаментальные знания о структурно-функциональной и молекулярной организации специфических доменов в ядрах ооцитов нового модельного объекта – жука-чернотелки *Tribolium castaneum*. Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и обоснованные результатами положения, выдвигаемые для публичной защиты, что свидетельствует о заметном личном вкладе автора диссертации в науку.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Артема Михайловича КИСЕЛЕВА «Состав ядерных доменов и динамика слитного белка Y14-Мус в ооцитах жука *Tribolium castaneum*», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология полностью соответствует профилю Совета Д 002.230.01, является самостоятельным завершенным научным исследованием, выполненным на актуальную тему, которое полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Артем Михайлович Киселев заслуживает присуждения ученой степени

кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Доктор биологических наук, профессор,

Александр Викентьевич Родионов
Заведующий лабораторией биосистематики и цитологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Ботанический институт им. В.Л. Комарова
Российской академии наук
197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2
avrodionov@binran.ru
+7-812-3725435

«_25_» марта 2015 г.

Подпись руки Родионова А.В.
ЗАВЕРЯЮ Мат. ср. Нервникова
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук