

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Шубиной Марии Юрьевны
на тему: «Механизмы накопления фибрилларина в ядре и ядрышке»
по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология,
гистология»

Актуальность темы диссертационного исследования

Фибрилларин (FBL) является эволюционно консервативным белком, который катализирует сайт-специфическое 2'-О-метилирование остатков рибозы в пре-рРНК, участвует в процессинге пре-рРНК и регулирует транскрипцию рРНК, метилируя остаток глутамина в гистоне H2A. FBL играет ключевую роль в формировании и поддержании структурной целостности плотного фибриллярного компонента ядрышка. FBL состоит из трех доменов. При этом С-концевой и метил-трансферазный домен демонстрируют наибольший консерватизм нуклеотидной последовательности от архей до млекопитающих, в то время как N-концевой GAR-домен проявляет большую гетерогенность у различных таксонов и встречается исключительно у эукариот, отсутствуя у архей. Функции GAR-домена изучены слабо, что делает работы, направленные на исследования его эволюционной значимости и особенности его накопления в ядре и ядрышке, чрезвычайно актуальными. В последние годы были получены данные о роли GAR-домена FBL в формировании плотного фибриллярного компонента (ПФК) ядрышка. Этот домен содержит группы положительно заряженных аминокислотных остатков аргинина, что характерно для сигналов ядерной (NLS) и ядрышковой (NoLS) локализации. В силу этого, имеющиеся данные позволяют предположить, что GAR-домен необходим для накопления фибрилларина в ядре и ядрышке, однако детальный механизм его транспорта остается неизученным. Представленная работа раскрывает важные аспекты

этого механизма и является несомненно актуальной для современной клеточной биологии.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Основные научные положения и выводы, сформулированные в работе, обоснованы и логично следуют из тех результатов, которые были получены автором в ходе выполнения работы. Выводы соответствуют поставленным задачам. Все задачи, поставленные автором, выполнены, и цель работы достигнута – изучена роль GAR-домена в накоплении фибрилларина в ядре и ядрышке. В работе применяются самые современные методы клеточной биологии, генной инженерии и молекулярной биологии, цитологии и гистологии. Работа выполнена на высоком методическом уровне с помощью современного оборудования. Научные положения, выдвинутые автором, обоснованы полученными результатами, достоверность которых не вызывает сомнения.

Общая оценка работы

Изложение научно-квалификационной работы построено по стандартному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 170 источников. Работа изложена на 132 страницах, содержит 43 рисунка и 9 таблиц. Библиографический список содержит ссылки на 170 литературных источников. Литературные данные и результаты экспериментальных исследований структурированы, подразделы отражают фактический ход исследования и логически связаны друг с другом.

В обзоре литературы подробно описывается структура фибрилларина, его GAR-домена и метилтрансферазного домена, приводится описание механизмов выбора метилируемых нуклеотидов пре-рРНК и сборки пре-РНК

комплексов, указываются неядрышковые функции фибрилларина. Обзор литературы достаточно полон, но не избыточен.

В разделе материалы и методы приводится описание плазмид, использованных автором, и примененных методов. Все методики описаны достаточно подробно, чтобы можно было их повторить. Приятное впечатление производит широкий диапазон подходов. Мария Юрьевна использовала современные методы генной инженерии для получения и экспрессии различных вариантов фибрилларина и отдельно GAR-домена самостоятельно или в виде белков, слитых с GFP и другими флуоресцентными белками, как в дрожжах, так и в линии клеток HeLa. Автор также использовала последовательный сайт-направленный мутагенез для замены аргининов в GAR-доме на другие аминокислоты. Помимо прочего автор применил методы MALDI-TOF масс-спектрометрии, FRAP-анализ, обработку клеток ингибиторами импортинов, ингибирование синтеза АТФ и многие другие. Спектр примененных методов действительно впечатляет.

В главе «Результаты» автор приводит основные результаты своей работы, которые излагаются последовательно и логично следуют один за другим.

Марии Юрьевне удалось составить стройную картину того, какую роль в ядерной и ядрышковой локализации FBL играет GAR-домен. Эксперименты по слиянию клеток показывают, что GAR-домен необходим для локализации FBL в ядро и, следовательно, включает в себя NLS. Данные, полученные автором, указывают на то, что метилирование аргининов в GAR-доме играет в этом процессе не последнюю роль. Интересно отметить, что ингибирование импортинов не приводило к изменению динамики накопления FBL в ядре, следовательно, детализированный механизм остается открытым. Автор также показала, что GAR-домен способствует накоплению FBL и в ядрышке, хотя ведущую роль в этом процессе играют другие домены FBL, судя по экспериментам по транспорту *lacZ* и морфометрическому анализу делеционных мутантов FBL в клетках HeLa. Марии Юрьевне

удалось продемонстрировать, что GAR-домен обеспечивает динамичное накопление FBL в гранулярном компоненте ядрышка, в то время как другие домены FBL обеспечивают относительно медленное накопление в плотном фибриллярном компоненте. Автор убедительно показала, что электрический заряд аминокислотных остатков GAR-домена важен для накопления FBL в ГК ядрышка, а метилирование этих же остатков, напротив, препятствует этому процессу. Таким образом, автором были получены новые детальные научные данные о механизме накопления фибрилларина в ядре и в ядрышке, и решена актуальная научная задача современной клеточной биологии.

Замечания и вопросы

1) В материалах и методах отсутствует раздел «Статистический анализ». Это приводит к казальным бы незначительным неточностям в интерпретации результатов, но в итоге именно они заставляют автора делать неверные заключения. Так, например, на рис. 24 и рис. 38 автором исследовалась роль энергозависимого NLS-опосредованного активного транспорта FBL в ядро. Автор исследовал эффективность накопления фибрилларинового домена GAR, слитого с GFP, в ядро в стандартных условиях и в условиях истощения АТФ. На мой взгляд, в обоих случаях налицо отсутствие статистически значимых различий, но автор утверждает, что имеет место «незначительное, но достоверное снижение эффективности накопления». На рисунках отличие одного среднего от другого составляет приблизительно 15%, а ошибки измерения среднего порядка 25% в обоих случаях. При таких показателях сомнительно, что применение критерия Манна-Уитни может показать достоверные отличия, да еще и с $p < 0,002$ и $p < 0,0003$. Тем не менее, автор усматривает здесь различия. Впоследствии это заставило автора сделать заключение о том, что для накопления FBL в ядре важна как пассивная диффузия, так и активный транспорт. Считаю, что такой вывод неправомерен. Мою позицию подкрепляют данные других экспериментов,

приведенных в работе. В частности, автор показал, что обработка клеток ингибиторами α - и β -импортинов не приводила к изменению накопления FBL в ядре (см. рис.25). С другой стороны, на том же рис. 38 более выраженные различия наблюдаются в эффективности локализации GAR в стандартных условиях и при подавлении метилирования белков, а различия с мутированным GAR-K7, где все аргинины заменены на лизины, у которых отсутствует метилирование, и вовсе претендуют на статистическую значимость. Однако автор её, к сожалению, не оценивает. А это было бы очень стати, потому что в совокупности с данными рис. 41, на котором показано, что ингибирование метилирования приводит к увеличению накопления GAR в ядрышках (как и замена R \rightarrow K), это подкрепляет совершенно справедливый вывод автора о роли метилирования остатков аргинина в GAR-доме в ядерной локализации FBL – оно способствует транспорту в ядро, но затрудняет дальнейшую локализацию в ядрышко.

2) Автор почему-то слишком осторожно, на мой взгляд, рассуждает о роли положительного заряда в GAR-доме для накопления FBL в ядрышке. Мария Юрьевна убедительно продемонстрировала, что последовательное удаление заряженных аминокислот в GAR-доме приводит к последовательному снижению эффективности накопления GAR в ядре. И в серии других экспериментов также показала, что замена аминокислот на нейтральные приводит к снижению накопления GAR в гранулярном компоненте ядрышка. Что, если не это является прямым доказательством ведущей роли электростатических взаимодействий в ядрышковой локализации FBL? Автор же почему-то очень осторожно называет результаты своих экспериментов «косвенным свидетельством», «непрямым доказательством» и «не противоречащим представлению». Мне кажется, как раз здесь стоит быть более смелым, или пусть меня переубедят. На мой взгляд, это достойно того, чтобы оказаться в выводах.

3) Совершенно удивительные данные, полученные на дрожжах, демонстрирующие, что FBL необходим для выживания клеток, и что замены в одном только GAR домене приводят к их гибели. При том, что замена (R → K) существенно не влияет на локализацию FBL в ядре и ядрышке. По-видимому, этот участок критически важен не только для транспорта FBL, но также и его взаимодействия с компонентами мякРНП, процессинга пре-рРНК. К сожалению, это почти никак не обсуждается.

4) Меня порадовала часть работы с FRAP и математическим моделированием. Марии Юрьевне убедительно удалось показать, что GAR-домен отвечает за динамичную локализацию FBL в ГК ядрышка, а метилтрансферазный домен – за более медленное накопление FBL в ПФК ядрышка. Почему это не вошло в выводы?

Заключение

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Шубина Мария Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения
Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства
здравоохранения России

Бигильдеев Алексей Евгеньевич

04.12.2019

Контактные данные:

тел.: , e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.01.21 — Гематология и переливание крови

Адрес места работы:

125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4.

Тел.: +7 (495) 612-64-63; e-mail: nauka@blood.ru

Подпись сотрудника ФГБУ «НМИЦ гематологии»

Минздрава России А.Е. Бигильдеева удостоверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

к.м.н. Джулакян У.Л.

