

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

Работа Шубиной М.Ю. «Механизмы накопления фибрилларина в ядре и ядрышке» посвящена актуальной проблеме - эволюции консервативного ядрышкового белка фибрилларина, в частности причинам появления в этом белке дополнительного неструктурированного GAR-домена при переходе от архей к эукариотам. Большинство аргининов в составе GAR-домена подвергаются посттрансляционному асимметричному диметилированию. В своей диссертационной работе автор высказывает гипотезу, что появление GAR-домена могло быть связано с необходимостью накапливать фибрилларин в ядре и ядрышке, а также для его правильного функционирования. Фактически, этот домен адаптировал фибрилларин к функционированию в составе эукариотической клетки.

Особую актуальность имеет изучение механизмов, обеспечивающих ядерно-цитоплазматический транспорт белков, необходимых для правильного функционирования клетки. Известно, что за избирательное накопление белков ядре могут отвечать сигналы ядерной локализации (NLS). Также выделяют специальные аминокислотные последовательности, называемые сигналами ядрышковой локализации (NoLS), которые приводят к накоплению белков в ядрышке. Автор ставит перед собой задачи понять, с помощью какого механизма GAR-домен может способствовать накоплению фибрилларина в ядре и ядрышке, а также пытается понять роль метилирования в этих процессах. Опубликованные данные о вовлеченности GAR-домена для специфической локализации сильно разнятся. Слабо изучен

и вопрос о том, имеет ли какое-либо функциональное значение метилирование аргининов в составе GAR-домена фибрилларина. Таким образом, актуальность и новизна диссертационной работы Шубиной М.Ю. не вызывает сомнений.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 132 страницах и включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Заключение», «Выводы», «Благодарности», «Список литературы». Работа содержит 43 рисунка и 9 таблиц. В диссертации процитировано 170 работ.

Во разделе «Введение» автор обосновывает актуальность и новизну исследования, обозначает цели и задачи работы. В этой части диссертации представлены научная и практическая новизна, приводятся положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы построен логично и содержит основную информацию, необходимую для понимания и интерпретации данных, представленных в диссертации. Помимо описания структуры, основных функций фибрилларина, а также макромолекулярных комплексов, в составе которых функционирует фибрилларин, автор освещает неядрышковые функции фибрилларина, связанные с развитием патологических процессов и динамикой старения организма.

В разделе «Материалы и методы» приведено большое количество современных методов молекулярной биологии, генной инженерии и клеточной биологии, использованных автором. Большинство методов описано довольно подробно.

В ходе исследования проделан большой объём экспериментальной работы и раздел «Результаты» состоит из четырех основных частей. В первой части на примере дрожжевой модели автор освещает роль GAR-домена в функционировании фибрилларина, а также вопрос о влиянии метилирования

GAR-домена на функциональную активность белка. Используя метод комплементации генов на дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae*, было показано, что GAR-домен фибрилларина необходим для его функционирования. Также, используя мутантные неметилируемые формы фибрилларина, было продемонстрировано, что метилирование аргининов в GAR-домене, по-видимому, играет важную роль в функционировании фибрилларина. Вторая часть результатов посвящена изучению роли GAR-домена в накоплении белка в ядре. Было показано, что полноразмерный фибрилларин не способен свободно диффундировать через ядерные поровые комплексы, и что для накопления в ядре белок может содержать NLS. Далее автор качественно и количественно демонстрирует, что GAR-домен содержит NLS. Показано, что активный ядерный импорт за счет GAR-домена отвечает только за часть накопления в ядре, однако должен существовать еще дополнительный механизм накопления в ядре, связанный, например, с взаимодействием с компонентами ядра. Третья часть работы отражает роль GAR-домена в накоплении белка в ядрышке. Автор показывает, что фибрилларин имеет двойную локализацию в ядрышке – в плотном фибриллярном компоненте и в гранулярном компоненте, причем за локализацию в плотном фибриллярном компоненте отвечает метилтрансферазный домен, а за локализацию в гранулярном компоненте – GAR-домен. Используя метод FRAP качественно и количественно было показано, что удержание белка внутри гранулярного компонента опосредовано чрезвычайно динамичными взаимодействиями GAR-домена с компонентами данного компартмента ядрышка. Для выявления механизма удержания белка в гранулярном компоненте были получены серии мутантных белков, где каждый последующий мутант содержал меньшее количество положительно заряженных аминокислот. Было показано, что механизм накопления фибрилларина в гранулярном компоненте за счет GAR-домена схож с NoLS-опосредованным накоплением внутри ядрышка. Четвертая часть результатов посвящена влиянию метилирования аргининов в

GAR-домене на накопление белка в ядре и ядрышке. Используя ингибитор метилирования AdOx, а также мутантные неметилируемые формы GAR-домена, было показано, что метилирование способствовало накоплению GAR-домена в ядре по энергозависимому механизму, то есть за счет NLS. С другой стороны, качественно и количественно было продемонстрировано, что метилирование снижает эффективность накопления GAR-домена в ядрышке, то есть не способствует его функционированию в качестве NoLS.

Основные результаты диссертационной работы Шубиной М.Ю. опубликованы в научной печати (3 статьи) и доложены на 7 российских и международных конференциях. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов

Все полученные автором результаты являются новыми и расширяют представления о сложившихся в научном сообществе представлениях о механизмах накопления белков в ядре и ядрышке, расширяют знания о механизмах эволюции белков. Достоверность результатов не вызывает сомнений. Сделанные выводы являются аргументированными, логичными и соответствуют полученным результатам.

Замечания и вопросы

1. В подразделе 2.12. приведено довольно сжатое описание культивирования М-HeLa клеток, тогда как для клеток линий ВНК и НЕК 293 условия культивирования не указаны. Следует также добавить, что отсутствует раздел «Статистика».

2. Раздел «Результаты» лучше обозначить как «Результаты и обсуждение».

3. На рисунках раздела «Результаты» на рисунках 24, 28, 29, 30, 38, 41 не указано, что использовал автор - «ошибку среднего» или «стандартное отклонение».

4. Список литературы, как указано выше, состоит из 170 источников, однако, 5 ссылок, которые присутствуют в тексте, не включены в список литературы.

Заключение

Указанные замечания имеют редакционный характер и 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, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Исаев Николай Константинович

03.12.2019

Контактные данные:

тел.: , e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.25 - Гистология, цитология, клеточная биология

Адрес места работы:

119234, Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1, стр. 12.

МГУ им. М.В.Ломоносова, биологический факультет

Тел.: 8-(495) 939-17-94; e-mail:

Подпись сотрудника биологического факультета

МГУ им.М.В.Ломоносова Н.К. Исаева удостоверяю:

ученый секретарь Ученого совета

биологического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова

Петрова Е.В.

