

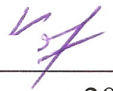
ФАНО РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИБГ РАН)

Бавилова ул., 34/5, Москва, 119334
Тел.: 8(499)135-60-89; 8(499)135-98-84 Факс: 8(499)135-41-05
<http://www.genebiology.ru>; e-mail: info@genebiology.ru
ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН 7736020369 КПП 773601001



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по
научной работе ИБГ РАН, д.б.н.

 И.В. Коробко
«29» января 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Жиронкиной Оксаны Андреевны
«Изучение механизмов роста ядерной ламины в интерфазе»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология,
цитология, гистология»

Ядерная ламина является сложным и многофункциональным клеточным компонентом, играющим важную роль в регуляции жизнедеятельности клеток. Несмотря на значительное количество накопленных данных по изучению этой структуры, существует много белых пятен в понимании механизмов её функционирования. Ядерная ламина работает не просто как барьер между ядром и цитоплазмой, но обеспечивает поддержание стабильности генома, участвуя в регуляции процессов транскрипции и репликации. Безусловно, всесторонние исследования механизмов сборки, организации, и функционирования ядерной ламины является актуальной задачей как для фундаментальной, так и для прикладной науки, так как эти знания могут быть использованы в медицинской практике, в частности для лечения и профилактики ламинопатий. Диссертация О.А. Жиронкиной как раз и находится в русле этого важного направления и посвящена

исследованию механизмов роста и организации ядерной ламина в зависимости от фазы клеточного цикла. В работе были впервые продемонстрированы важные особенности роста и организации ядерной ламина, а также их взаимосвязь с фазой клеточного цикла и репликацией хроматина.

Диссертационная работа объемом 140 листов, включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список цитируемой литературы» и «Приложения». В диссертации содержится 39 рисунков.

Обзор литературы включает в себя 17 подразделов и подробно описывает тонкую структуру ядерной оболочки, её молекулярное строение и функции. Кроме того, в литературном обзоре подробно рассматриваются многосторонние взаимосвязи ядерной ламина с процессами транскрипции, репликации, репарации и клеточной смерти. Важно, что литературный обзор имеет подраздел, посвященный патологическим состояниям, связанным с нарушением функций ядерной ламина – ламинопатиям, в котором подробно рассмотрены причины и некоторые механизмы этих заболеваний. Стоит отметить логичность и грамотность построения литературного обзора, который имеет самостоятельную ценность и дает достаточно полное представление об области исследования и состоянии исследуемой проблемы.

В разделе «Материалы и методы» автор подробно описывает использованные экспериментальные процедуры, которые включают широкий арсенал методов молекулярной и клеточной биологии, что говорит о высоком профессиональном мастерстве автора. Информация, представленная в этой главе, дана корректно, а описание большинства методов позволяет воспроизвести их без использования дополнительной литературы.

Раздел «Результаты» разбит на 6 глав, при чтении которых можно с легкостью проследить общий ход рассуждений и взаимосвязь экспериментов друг с другом. В первой главе автор демонстрирует, что рост ядерной оболочки клеток происходит равномерно на протяжении всей интерфазы. Для этого был адаптирован алгоритм анализа изображений на основе программы CellProfiler, а полученные с помощью этого подхода результаты были подтверждены с помощью

прижизненной микроскопии. Затем с помощью микроскопии высокого разрешения и программной обработки полученных изображений автор подробно характеризует микродоменную структуру ламины, и на основе полученных результатов заключает, что микродоменная организация ламины и степень её полимеризации остаются неизменными на протяжении клеточного цикла.

Следующие главы посвящены всестороннему изучению роста и динамики сборки ламины, а также её взаимосвязи с хроматином на примере разработанной автором модельной системы. Автором сделан ряд интересных наблюдений, и продемонстрировано, что образование сетей ламинов А и С происходит независимо от ламина В1, что указывает на принципиально разные механизмы интеграции этих белков в процессе сборки ядерной оболочки. Кроме того, весьма любопытны результаты исследования скорости обмена ламинов в разных фазах клеточного цикла. Показано, что встраивание ламина А в состав ламины происходит не зависимо от стадии клеточного цикла, в то время как встраивание ламина В более активно происходит в S-фазе.

Наконец с помощью разнообразных микроскопических подходов и программных методов анализа автор убедительно демонстрирует, что репликация периферического хроматина не приводит к откреплению хроматина от ядерной оболочки и не вызывает в ней каких-либо глобальных структурных изменений.

Таким образом, можно заключить, что эксперименты, проделанные Жиронкиной О.А. грамотно спланированы, и их результаты корректно интерпретированы. Цели, поставленные в работе, достигнуты. Не вызывает сомнения также новизна работы и её научная значимость. Полученные результаты имеют как практическое, так и теоретическое значение, так как расширяют наше понимание механизмов функционирования и организации ядерной оболочки клеток.

Работа не лишена некоторых недостатков. Так в разделе 4.1.1. при построении гистограммы распределения клеточного цикла, полученного с помощью анализа интегральной интенсивности DAPI было обчислено всего 249 клеток. Обсчет хотя бы тысячи клеток дал бы более качественное и достоверное распределение по фазам клеточного цикла, тем более что при использовании высокопроизводительного микроскопического скрининга анализ большого

количества клеток представляется вполне выполнимым. Кроме того, было бы неплохо убедиться в адекватности полученных таким образом распределений с помощью проточной цитофлуориметрии.

В разделе 4.2.1. при анализе экваториальных срезов ядра выявляются участки, не содержащие ни одной из форм ламинов, что, как предполагает диссертант, может являться сайтами локализации комплексов ядерной поры. Было бы не лишне проверить это предположение, используя двойное иммуноокрашивание препарата против какого-либо белка ядерной поры вместе с ламином.

В разделе 4.2.3. не ясно какое количество клеток для каждой из фаз обсчитывалось при анализе интенсивности флуоресценции ламина А (рис.19д), а также при анализе доли участков со сниженной плотностью ламинов (рис.20д). Кроме того, совершенно не понятно, почему на рисунке 20 представлены примеры экваториальных срезов для ламина А, однако гистограмма долей участков со сниженной плотностью представлена для ламина В1.

В разделе 4.2.4. утверждается, что деполяризацию ламины можно выявить, применяя пермеабиллизацию клеток с помощью 0,1% раствора тритона X-100. Однако, если это общеизвестный подход, то необходимо указать ссылку на оригинальную методику, если же этот метод разработан диссертантом, то желательно привести доказательства, что подобная обработка эффективно удаляет свободный ламин из клетки, например с помощью вестерн блота экстрагируемой фракции. Иначе, создаётся впечатление, что все последующие результаты, полученные с помощью данного подхода могут являться следствием неэффективной экстракции несвязанного ламина.

Неудачно продемонстрированы результаты синхронизации клеток в разделе 4.5. Хотелось бы видеть гистограммы распределения фаз клеточного цикла полученные либо с помощью проточной цитофлуориметрии, либо с помощью уже использованного в диссертации подхода на основе программного анализа изображений.

Далее на рисунке 31 приводятся результаты вестерн блот анализа количества ламинов в растворимой фракции клеток, однако не представлены таковые результаты для полимеризованной формы. Кроме того, хотелось бы видеть

сравнение общего количества ламина в тотальных клеточных лизатах (без экстракции), что дало бы ответ на вопрос об изменчивости уровня экспрессии ламина в разных фазах клеточного цикла.

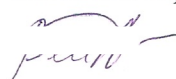
Наконец вывод № 5 требует более аккуратной формулировки, так как в работе напрямую не была доказана взаимосвязь между встраиванием ламина В1 и репликацией. Да, результаты, полученные с помощью FRAP, свидетельствуют о большей скорости обмена ламина В1 в S-фазных клетках по сравнению с не-S-фазными. Однако для утверждения, что этот эффект напрямую связан с репликацией хроматина, необходимо проанализировать скорость обмена ламина В1 в условиях ингибирования синтеза ДНК.

Все перечисленные замечания в большей степени носят рекомендательный характер. Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы, её теоретическая и практическая значимость позволяют сделать вывод и том, что данная диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а её автор Жиронкина Оксана Андреевна заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 «Клеточная биология, цитология, гистология».

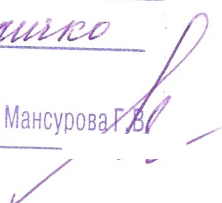
Отзыв обсужден и утвержден на объединенном семинаре лаборатории структурно-функциональной организации хромосом и группы пространственной организации генома ИБГ РАН 27 января 2016 г.

Научный сотрудник
лаборатории структурно-функциональной
организации хромосом ИБГ РАН,
к.б.н.
Тел. 4991359787
velichkoak@gmail.com

Величко Артём Константинович



ПОДПИСЬ А.К. Величко
ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь ИБГ РАН Мансурова Г.В.



СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
по диссертации Жиронкиной Оксаны Андреевны
«Изучение механизмов роста ядерной ламины в интерфазе»,
представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Полное и сокращенное наименование:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Почтовый адрес:

119334, Москва, ул. Вавилова, дом 34/5

Тел.: 8(499)1356089, 8(499)1359884, Факс: 8(499)1354105

E-mail: info@genebiology.ru

Адрес официального сайта в сети Интернет: www.genebiology.ru

Директор: академик, доктор биологических наук, профессор Георгиев Павел Георгиевич

Список основных публикаций ведущей организации по теме
диссертационной работы О.А. Жиронкиной:

1. Velichko A.K., Petrova N.V., Razin S.V., Kantidze O.L. Mechanism of heat stress-induced cellular senescence elucidates the exclusive vulnerability of early S-phase cells to mild genotoxic stress. *Nucleic Acids Research*, 2015. 43 (13), 6309-6320.

2. Ulianov SV, Khrameeva EE, Gavrillov AA, Flyamer IM, Kos P, Mikhaleva EA, Penin AA, Logacheva MD, Imakaev MV, Chertovich A, Gelfand MS, Shevelyov YY, Razin SV Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains. *Genome Research*, 2015. 26(1), 70-84.

3. Erokhin M, Elizar'ev P., Parshikov A, Schedl P, Georgiev P, Chetverina D. Transcriptional read-through is not sufficient to induce an epigenetic switch in the silencing activity of Polycomb response elements. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015. 112(48), 14930-5.

4. Bonchuk A, Maksimenko O, Kyrchanova O, Ivlieva T, Mogila V, Deshpande G, Wolle D, Schedl P, Georgiev P. Functional role of dimerization and CP190 interacting domains of CTCF protein in *Drosophila melanogaster*. *BMC Biol*. 2015. 7; 13:63.

5. Maksimenko O, Bartkuhn M, Stakhov V, Herold M, Zolotarev N, Jox T, Buxa MK, Kirsch R, Bonchuk A, Fedotova A, Kyrchanova O, Renkawitz R, Georgiev P. Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin. *Genome Research*. 2015. 25(1), 89-99.

6. Petrova N.V., Velichko A.K., Kantidze O.L., Razin S.V. Heat shock-induced dissociation of TRF2 from telomeres does not initiate a telomere-dependent DNA damage response. *Cell Biology International*, 2014. 38 (5), 675-81.

7. Gavrillov AA, Chetverina HV, Chermnykh ES, Razin SV, Chetverin AB. Quantitative analysis of genomic element interactions by molecular colony technique. *Nucleic Acids Res.*, 2014. 42(5).

8. Chang H.W., Kulaeva O.I., Shaytan A.K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K.V., Kirpichnikov M.P., Clark D.J., Studitsky V.M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription. *Nucleic Acids Res.*, 2014. 42(3):1619-27

9. Velichko A.K., Markova E.N., Petrova N.V., Razin S.V., Kantidze O.L. Mechanisms of heat shock response in mammals. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013. 70 (22), 4229-4241.

10. Gavrilov AA, Golov AK, Razin SV. Actual ligation frequencies in the chromosome conformation capture procedure. PLoS One. 2013, 8(3):e60403.

11. Velichko A.K., Petrova N.V., Kantidze O.L., Razin S.V. Dual effect of heat shock on DNA replication and genome integrity. Molecular Biology of the Cell, 2012. 23(17), 3450-3460.

12. Velichko A.K., Lagarkova M.A., Philonenko E.S., Kiselev S.L., Kantidze O.L., Razin S.V. Sensitivity of human embryonic and induced pluripotent stem cells to a topoisomerase II poison etoposide. Cell Cycle, 2011. 10 (12), 2035-2037.

13. Velichko A.K., Kantidze O.L., Razin S.V. HP1 α is not necessary for the structural maintenance of centromeric heterochromatin. Epigenetics, 2011. 6 (3), 380-387.

Ученый секретарь ИБГ РАН
к.б.н.



Мансурова Г.В.