

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА  
Д 002.230.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
ПО ДИССЕРТАЦИИ **КИСЕЛЁВА АРТЁМА МИХАЙЛОВИЧА**  
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 10 апреля 2015 г., прот. № 196/375

О присуждении **КИСЕЛЁВУ АРТЁМУ МИХАЙЛОВИЧУ** (Россия) учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация **«СОСТАВ ЯДЕРНЫХ ДОМЕНОВ И ДИНАМИКА СЛИТОГО БЕЛКА Y14-МУС В ООЦИТАХ ЖУКА *TRIBOLIUM CASTANEUM*»**

**по специальности** 03.03.04 – "Клеточная биология, цитология, гистология" **принята к защите** 23.01.2015 г., протокол № 192/371 Диссертационным советом Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, адрес: 194064, Тихорецкой проспект, д. 4, Санкт-Петербург, Россия, утвержден приказом Минобрнауки РФ № РФ № 105/нк от 11.04.2012 г.

**Соискатель Киселёв Артём Михайлович**, 1986 года рождения, в 2009 году окончил биологический факультет Государственного педагогического университета А.И. Герцена по специальности «Биология» с присвоением квалификации «учитель биологии». С 2006 по 2007 год работал старшим лаборантом в Лаборатории электронной микроскопии Санкт-Петербургского государственного университета. С 2007 по 2009 год работал на должности старшего лаборанта-исследователя в Лаборатории экспериментальной

эмбриологии Биологического института Университета. С 30.06.2009 по 29.06.2012 год проходил очную аспирантуру на базе Лаборатории морфологии клетки Института цитологии Российской академии наук. С 2012 года по настоящее время Артём Михайлович **совмещает работу** старшего лаборанта-исследователя Группы некодирующей ДНК при Лаборатории морфологии клетки Института цитологии с работой в качестве научного сотрудника в Федеральном государственном бюджетном учреждении "Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр" Минздрава РФ.

Диссертация выполнена в Лаборатории морфологии клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук.

**Научные руководители:**

1. Доктор биологических наук, профессор **ПОДГОРНАЯ ОЛЬГА ИГОРЕВНА** ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии клетки, группы некодирующей ДНК Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук.
2. Доктор биологических наук **БОГОЛЮБОВ ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ** заведующий лабораторией морфологии клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук

**Официальные оппоненты:**

1. **САЙФИТДИНОВА АЛСУ ФАРИТОВНА**, кандидат биологических наук, доцент кафедры цитологии и гистологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет.
2. **РОДИОНОВ АЛЕКСАНДР ВИКЕНТЬЕВИЧ**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией

биосистематики и цитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический институт имени В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург.

**- дали положительные отзывы на диссертацию.**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук (ИБР РАН) (Москва), в своём положительном заключении (заключение составлено, доктором биологических наук, заведующим лабораторией структурно-функциональной организации эукариотических хромосом Глазковым Михаилом Васильевичем, утверждено директором ИБР РАН, доктором биологических наук, профессором Озернюком Николаем Дмитриевичем) **указала, что** диссертационная работа представляет собой самостоятельный научно-исследовательский труд, посвящённый актуальной проблеме изучения структурно-функциональных особенностей ядерных доменов, результаты представляют научно-практическую ценность; диссертация соответствует требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней" в редакции 2013 года, а ее автор, Киселёв Артём Михайлович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - "Клеточная биология, цитология, гистология"

**- дала положительный отзыв на диссертацию.**

**Соискатель имеет 12 опубликованных работ, в том числе 10 по теме диссертации, из них 3 статьи (объемом 1,5 печ. листа) в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 7 тезисов докладов.**

**Наиболее значимые работы по теме диссертации:**

1. Bogolyubov D.S., Batalova F.M., **Kiselyov A.M.**, Stepanova I.S. 2013. Nuclear structures in *Tribolium castaneum* oocytes. *Cell Biol. Int.* 37: 1061—1079. В статье впервые представлены данные о строении и составе универсальных экстрахромосомных ядерных доменов нового лабораторного насекомого, жука *T. castaneum*.

2. Боголюбов Д.С., Баталова Ф.М., **Киселёв А.М.**, Парфенов В.Н. 2012. Распределение 5'-триметилгуанозин-кэпированных малых ядерных РНК в экстрахромосомных ядерных структурах ооцитов лабораторного насекомого *Tribolium castaneum*. Докл. АН. 444 (6): 691—694.

В статье дана характеристика внутриядерного распределения 5'-триметилгуанозин-кэпированных малых ядерных РНК в экстрахромосомных ядерных структурах ооцитов жука *Tribolium castaneum*.

3. Боголюбов Д.С., **Киселёв А.М.**, Шабельников С.В., Парфенов В.Н. 2012. Полиаденилированные РНК и факторы экспорта мРНК в связи с экстрахромосомными ядерными доменами вителлогенных ооцитов насекомого *Tenebrio molitor*. Цитология. 54 (6): 497—507. В статье дана характеристика внутриядерного распределения полиаденилированных РНК и факторов экспорта мРНК в экстрахромосомных ядерных структурах ооцитов жука *Tenebrio molitor*.

#### **На диссертацию и автореферат поступили отзывы:**

1. Отзыв заместителя директора по научной работе ФГБУН ИНЦ РАН, главного научного сотрудника с возложением обязанностей заведующего лабораторией цитологии одноклеточных организмов доктора биологических наук **Сергея Орестовича Скарлато**.

Отзыв положительный, имеются замечания: "...Данные, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, достаточно полно изложены в 10 научных работах, в том числе в 3-х статьях в журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации. Одна статья опубликована в международном журнале *Cell Biology International* (импакт-фактор 1,635). Однако, к

сожалению, в большинстве публикаций диссертант выступает не в качестве первого автора.

Автореферат отражает содержание проделанной работы, выводы диссертации соответствуют полученным результатам и неплохо аргументированы. Вместе с тем, осталась непонятной логика использования клеток человека для анализа экспрессии мРНК жука.

В целом диссертация КИСЕЛЁВА Артёма Михайловича «Состав ядерных доменов и динамика слитого белка Y14-Мус в ооцитах жука *Tribolium castaneum*» по актуальности проблемы, качеству представленного материала и новизне полученных результатов является научно-квалификационной работой, в которой успешно решен целый спектр задач, имеющих существенное значение для развития современной клеточной биологии.

Работа соответствует критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, КИСЕЛЁВ Артём Михайлович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - "Клеточная биология, цитология, гистология".

2. Отзыв заведующего лабораторией клеточного цикла института молекулярной и клеточной биологии сибирского отделения РАН, доктора биологических наук **Леонида Владимировича Омелянчука**. Отзыв положительный, без замечаний.

3. Отзыв начальника отдела рекомбинантных технологий ООО «Протеиновый контур», кандидата биологических наук **Бориса Владимировича Мурашева**. Отзыв положительный, без замечаний.

4. Отзыв заведующего лабораторией эволюционной цитогенетики НИИ биологии и биофизики клетки Томского государственного университета, доктора биологических наук, профессора **Владимира Николаевича Стегния** и старшего научного сотрудника Томского государственного университета, доцента кафедры гистологии и генетики **Глеба Николаевича Артёмова**. Отзыв положительный, имеются замечания: "...Среди

недостатков работы следует отметить, что автором практически не обосновано в чем заключаются «несомненные преимущества» жука *Tribolium castaneum* перед другими модельными объектами, в частности *Drosophila*, хотя эти преимущества вероятно имеют место. Кроме того, следует отметить постановку слишком узких задач (таких как 2 и 5), которые являются необходимыми, но все же второстепенными, методического уровня. Вероятно, с этим недочетом также связано и слишком большое число основных положений (их 6). Такие результаты как методика временного культивирования... адаптирована» и «конструкция мРНК... экспрессируется», не являются основными положениями, а упоминание об одном из них в выводах неуместно. Однако формальные недочеты не портят общего впечатления от данной диссертационной работы...".

**В деле имеется справка о практической ценности результатов диссертационной работы А.М.Киселёва и об их использовании в курсах**

- «Методы современной клеточной биологии» - для студентов и бакалавриата
- «Структурные белки ядра» - для студентов магистратуры (магистерская программа «Биология», профиль «Клеточная биология, цитология, гистология, иммунология») Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ). Справка утверждена проректором по учебно-методической работе СПбГУ, к.ю.н. М.Ю.Лавриковой.

**В дискуссии принимали участие:**

1. Доктор биологических наук **Е. С. Снигиревская**, член Совета
2. Доктор биологических наук, профессор **С.Н. Борхсениус**, заместитель председателя Совета
3. Доктор биологических наук, профессор **Е. Р. Гагинская**, член Совета
4. Доктор биологических наук, профессор, академик **Н. Н. Никольский**, член Совета

**Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается** высокой квалификацией выбранных специалистов, в области молекулярного состава клеточного ядра, клеточной биологии, в частности структуры и функции различных компартментов эукариотического ядра, для более объективной оценки полученных результатов, представленных в диссертации.

**Диссертационный совет отмечает, что** на основании выполненных соискателем исследований:

**разработана** новая научная идея, согласно которой капсула кариосферы содержит не только структурные белки ядерного матрикса, но значительные количества РНК, в том числе малые ядерные РНК (snРНК), при этом ядерные SC35-содержащие тельца (speckles) являются транзитными для некоторых факторов сплайсинга, что обогащает научную концепцию о роли капсулы кариосферы и универсальных ядерных доменов в биогенезе и транспорте ядерных рибонуклеопротеионов.

**предложена** оригинальная научная методика исследования белкового состава ядер ооцитов при помощи инъекций в ооплазму 5'-кэпированной синтезированной *in vitro* мРНК слитого белка, содержащей в своём составе кодирующую последовательность белка Y14 и Мус-эпитопа под одной рамкой считывания.

**доказана** возможность экспрессии и успешного импорта в ядро белкового продукта экзогенной искусственной мРНК содержащей кодирующую последовательность Y14-Мус под одной рамкой считывания.

**введены** новые представления согласно которым на этапах раннего вителлогенеза SC35-содержащие тела являются промежуточными сайтами локализации белка Y14, а капсула кариосферы — его дефинитивным компартментом на этапах позднего вителлогенеза.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**доказаны** положения, расширяющие существующие представления об особенностях ультраструктуры и молекулярного состава универсальных ядерных доменов (телец Кахала и кластеров интерхроматиновых гранул) в ооцитах насекомых

**применительно к проблематике диссертации использован** комплекс современных цитологических и молекулярно-биологических методов, включая конфокальную микроскопию, иммуноэлектронную микроскопию, молекулярное клонирование, секвенирование, различные типы электрофорезов, а также синтез искусственной РНК; кроме того, была разработана и успешно использована методика продолжительного содержания *in vitro* яйцевых трубок (овариол) жука *T. castaneum*.

**изложены** новые экспериментальные факты о составе универсальных экстрахромосомных ядерных доменов жука *T. castaneum* на этапах раннего и позднего вителлогенеза.

**раскрыты** особенности молекулярного состава и ультраструктуры универсальных ядерных доменов ооцитов *T. castaneum*. Показано, что в нуклеоплазме ооцитов *T. castaneum* присутствуют коилинсодержащие ядерные тела (аналоги телец Кахала) и SC35-содержащие тела (аналоги кластеров интерхроматиновых гранул, КИГ). SC35-содержащие тела содержат поли(А)<sup>+</sup>-РНК, белок A1 hnРНК, компоненты комплекса соединения экзонов (EJC), но не содержат ТМГ-кэпированные snРНК, характерные для типичных КИГ.

**изучены** особенности внутриядерного распределения белка Y14 на этапах раннего и позднего вителлогенеза ооцитов *T. castaneum* с использованием микроинъекции в ооциты синтезированной *in vitro* мРНК Y14-Мус.

**проведена** оценка возможности изучения пула РНК, содержащегося в капсуле кариосферы, методами секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing).



**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**разработана и внедрена в практику научного исследования** методика анализа белкового состава ядер ооцитов при помощи инъекций мРНК слитого белка.

**определены** перспективы применения теоретических результатов исследования в практике изучения состава ядерных доменов на широком круге объектов.

**представлены** новые данные о различном характере распределения в ядре белка Y14 на разных стадиях развития ооцита.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

**результаты**, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании (электронный микроскоп Zeiss LIBRA 120, конфокальный микроскоп Leica TCS SP5, микроинъектор Eppendorf 5242, совмещенный с инвертированным микроскопом Leica DM IRB и оснащённый микроманипулятором Narishige, секвенатор Applied Biosystems prism 3130, микрокапиллярный электрофоретический анализатор Agilent Bioanalyser 2100); выбор использованных методов обоснован поставленными в работе задачами;

**теория** о том, что на этапах раннего вителлогенеза SC35-содержащие ядерные тела являются транзитными экстрахромосомными доменами для белка Y14, а капсула кариосферы — его дефинитивным компартментом на этапах позднего вителлогенеза, построена на известных и проверенных литературных фактах и данных о составе ядерных доменов соматических клеток и ооцитов разных видов; данные, полученные из других источников, согласуются с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

**идея** базируется на анализе современных литературных данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала;

**использовано** сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по тематике диссертации;

**установлено**, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным;

**использованы** современные экспериментальные подходы (микроинъекции в ооциты насекомого полученной искусственно мРНК слитого белка, иммунофлуоресцентные и иммуноэлектронные методы исследования, конфокальная микроскопия, электронная микроскопия, методы генной инженерии, секвенирование ДНК, методы биоинформатики с использованием современных программных пакетов Vector NTI, Geneious, Bioedit, ImageJ, Microsoft Excel).

**Личный вклад соискателя состоит в:**

непосредственном участии соискателя в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации полученных с применением современных цитологических и молекулярно-биологических методов исследования экспериментальных данных. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований, подготовке и написании статей и тезисов по теме диссертации, представлял материалы диссертации на конференциях.

Диссертация А.М. Киселёва посвящена идентификации ядерных доменов ооцитов жука *T. castaneum* с использованием цитологических и молекулярно-биологических методов и является оригинальным, законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), по специальности 03.03.04 – "Клеточная биология, цитология, гистология".

На заседании 10 апреля 2015 года Диссертационный Совет принял решение присудить **КИСЕЛЁВУ АРТЁМУ МИХАЙЛОВИЧУ** учёную степень **кандидата биологических наук** по специальности 03.03.04 - "Клеточная биология, цитология, гистология".

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве **22** человек, из них **11** докторов по специальности рассматриваемой диссертации, учувствовавших в заседании, из **24** человек входящих в состав Совета, - проголосовали:

**«ЗА» - 21, «ПРОТИВ» - 1, недействительных бюллетеней - НЕТ.**

Председатель

Диссертационного совета Д 002.230.01

доктор биологических наук, профессор

Юдин А. Л.

Учёный секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01

кандидат биологических наук



Каминская Е. В.

13 апреля 2015 г.