

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Поповой Юлии Владимировны  
на тему «Роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast  
в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек веретена деления  
в культуре клеток S2 *Drosophila melanogaster*»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических  
наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология (биологические науки)  
в диссертационный совет 24.1.239.01, созданный на базе ИЦиГ СО РАН

Микротрубочки являются незаменимым компонентом в цитоплазме всех без исключения эукариотических клеток, поскольку образуют веретено клеточного деления. Это относится в том числе и к организмам, которым присущ так называемый закрытый митоз, протекающий без разрушения клеточной оболочки, как это наблюдается, например, у *Dictyostelium*. В некоторых случаях полюса веретена деления могут быть образованы моторными белками без участия центросом, однако всегда выполняются основные три правила митоза: 1) веретено деления состоит из микротрубочек, 2) хромосомы взаимодействуют с ними, 3) в анафазе всегда происходит расхождение сестринских хроматид и их перемещение к противоположным сторонам клетки. В процессе формирования веретена деления хромосомы являются не просто пассивным объектом для перемещения. Создавая локальное окружение, благоприятствующее нуклеации и стабилизации микротрубочек, они играют активную роль в образовании веретена. Именно эта их способность позволяет клеткам образовывать биполярные веретёна деления в отсутствие центросом. Таким образом, изучение молекулярных механизмов формирования митотического веретена является актуальной фундаментальной научной задачей, важность решения которой трудно переоценить.

Главная проблема при изучении роста микротрубочек от кинетохоров митотических хромосом состоит том, что этот процесс протекает очень быстро, и кроме того, одновременно с ростом центросомных микротрубочек. Техническими решениями этой проблемы является раздельная визуализация этих процессов, замедление скорости роста микротрубочек, либо физическое разделение процессов восстановления предварительно разобранных микротрубочек от этих сайтов нуклеации (центросом и/или кинетохоров). В представленной работе проводили исследование кинетохор-зависимого роста микротрубочек путём анализа их восстановления после деполимеризации холодом или митостатиками в клетках культуры S2 *D. Melanogaster*. Роль конкретных белков в данном процессе изучали посредством метода РНК-интерференции.

В ходе исследований автором были получены новые и приоритетные научные результаты. Для дальнейших исследований в этой области чрезвычайно интересным и практически полезным результатом является сделанное автором открытие, что воздействие колцемидом приводит к неспособности клеток повторно восстанавливать микротрубочки от centrosом, но не от кинетохоров. При этом холодовая обработка при температуре 0°C приводит к восстановлению микротрубочек как от хромосом/кинетохоров, так и от centrosом, а обработка температурой -1°C или -2°C обуславливает восстановление микротрубочек преимущественно от centrosом. В ходе работы впервые было показано, что РНК-и гена *mast*, *mei-38* или *mars* снижают динамику восстановления микротрубочек от хромосом/кинетохоров как после колцемидной, так и после холодной обработок, а также влияют на характер данного процесса. В то же время РНК-и гена *Eb1* снижает динамику кинетохор-зависимого восстановления микротрубочек и влияет на характер данного процесса лишь после обработки митостатиком. А снижение уровня белка *Non3* практически не влияет на динамику восстановления микротрубочек в обоих случаях. Также в диссертационной работе Поповой Ю.В. была впервые описана локализация фьюженов *Eb1-eGFP*, *Mars-eGFP*, *Mei-38-eGFP* и *Mast-eGFP* после полной разборки микротрубочек и в ходе восстановления веретена деления при отмывке митостатика.

Работа построена по традиционному принципу. Вначале приводится подробный список используемых сокращений и аббревиатур, что значительно облегчает дальнейшее восприятие материала, особенно при чтении обзора литературы. Собственно текст открывается главой «Введение», в которой рассмотрена актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна работы и её теоретическая и практическая значимость, приведены положения, выносимые на защиту и даны сведения об апробации работы, публикациях автора и его личном вкладе в выполнение исследований.

Обзор литературы разбит на подразделы и выполнен в соответствии с принципом «От общего к частному» - сначала приведены общие понятия о клеточном цикле и митозе, затем идут сведения о формировании веретена деления и динамике микротрубочек, после чего перечислены конкретные белки и приведена справка о методах деполимеризации микротрубочек и о культивируемых клетках дрозофилы. Обобщены все данные, приведённые в обзоре литературы, в подразделе «Заключение».

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные в ходе работы над диссертацией методы исследования. Поповой Ю.В. был применён широкий спектр самых современных цитологических, молекулярно-биологических и биохимических методов, в том числе РНК-интерференция, флуоресцентная конфокальная микроскопия, все методики, связанные с молекулярным клонированием, белковый электрофорез и Вестерн-блоттинг, количественный *real-time PCR* и т.д. Следует отметить скрупулёзную точность

автора в описании перечисляемых методов – от приведённых таблиц последовательностей использованных праймеров и таблиц с составами полиакриламидных гелей до перечисления всех тонкостей изготовления цитологических препаратов. Любому исследователю, пожелавшему воспроизвести описанные эксперименты, без труда может сделать это после ознакомления с текстом диссертации. Это красноречиво иллюстрирует долю личного участия автора в постановке описанных экспериментов.

В главе «Результаты» последовательно и подробно изложены полученные автором данные, начиная с описания подбора условий обработки клеток холодом или митостатиком. Следует отметить, что глава «Результаты», так же как и весь текст диссертации в целом, снабжена большим количеством качественного иллюстративного материала. В общей сложности работа изложена на 135 страницах, и при этом содержит 28 рисунков и 13 таблиц. Приведённые в диссертационной работе авторские иллюстрации исключительно высокого качества. После главы результатов следуют обсуждение, выводы и список используемой литературы, насчитывающий 252 наименования.

Текст диссертации хорошо написан и легко читается, практически не содержит опечаток. Однако, можно сделать ряд замечаний по тексту, два из которых относятся к разделу «Обзор литературы».

Первое.

На странице 20 в тексте присутствует фраза: «Выделяют два этапа анафазы – А и Б, которые отличаются механизмами, отвечающими за расхождение сестринских хроматид. В анафазе А хроматиды расходятся к полюсам за счет деполимеризации кинетохорных МТ на плюс-концах». Далее после этого справедливого утверждения следует нечто противоположное по смыслу: «Соответственно, в анафазе А участвуют моторные белки (белки, способные перемещаться по МТ, например, динеины и кинезины, использующие в качестве источника энергии АТФ (Kashina et al., 1996)), связанные с кинетохорами». На самом деле, вопросы генерации сил, приложенных к различным микротрубочкам в составе митотического веретена и к митотическим хромосомам, к настоящему времени достаточно подробно изучены. Так, было продемонстрировано, что в дрожжах, лишенных всех минус-концевых микротрубочковых моторных белков, хромосомы продолжают двигаться к полюсам веретена (*Microtubule depolymerization can drive poleward chromosome motion in fission yeast / The EMBO Journal / 2006 / 25:4888-4896*). Примерно в то же время было показано, что сил, продуцируемых разбирающимися микротрубочками, вполне достаточно для перемещения хромосом в митозе (*Force production by disassembling microtubules / Nature / 2005 / 438(7066):384-8*). Наконец, было показано, каким именно образом частицы, покрытые белком Ndc80, могут следовать за деполимеризующейся с плюс-конца микротрубочкой (*Fibrils connect*

microtubule tips with kinetochores suggesting ways to couple tubulin dynamics to chromosome motion / Cell / 2008 / 135(2): 322–333). Таким образом, общепринятой точкой зрения является то, что расхождение кинетохоров может осуществляться без затрат АТФ, то есть по определению этот процесс не зависит от моторных белков, поскольку их работа без АТФ невозможна. Можно сказать, что энергия для расхождения хромосом запасена в самих микротрубочках и высвобождается при их деполимеризации, поскольку исходно это энергия гидролиза GTP, происходящего после присоединения димера тубулина к плюс-концу растущей микротрубочки. В дальнейшем, в разделе 1.2.4 на странице 31, автор упоминает белок Ndc80, который как раз и обеспечивает подтягивание хромосом за счёт скольжения вдоль микротрубочки вследствие изгибания её протофиламентов при разборке. В любом случае, цитирование статьи Кашиной (An essential bipolar mitotic motor / 1996 / Nature) в данном контексте представляется неуместным, поскольку речь в ней идёт не о расхождении хромосом в анафазе митоза, а о взаимном скольжении межполюсных микротрубочек, и описывает, как биполярные кинезины способствуют расхождению полюсов при образовании веретена деления.

Второе.

На странице 26 многократно встречается обескураживающее словосочетание «скорость потока гетеродимера тубулина внутри микротрубочек». Очевидно, это является следствием использования машинного перевода, поскольку по-русски такая фраза будет означать, что внутри микротрубочек, как по водопроводным трубам, происходит движение раствора деполимеризованного тубулина. В действительности, микротрубочковый ток (по-английски - microtubule flux) – это явление, при котором микротрубочки веретена движутся к полюсам, разбираясь с минус-концов. До начала анафазы добавление новых гетеродимеров тубулина к плюс-концу микротрубочки уравнивает их потерю на минус-конце, и таким образом длина микротрубочки остается постоянной, несмотря на фактическое перемещение каждого её участка к полюсу веретена. В тексте диссертации автором указано, что рисунок 4 на стр.26 взят из статьи (Buster et al., 2007). В приведённой статье он является панелью 1В, при этом выше авторами статьи приведены снимки веретена и указано, что «скорость потока оценивали, обесцвечивая полоску поперёк флюоресцирующих микротрубочек веретена и прослеживая их движение по направлению к полюсу» (flux rates were measured by photobleaching rectangular bars across fluorescent spindle microtubules and tracking their poleward motions). Хотя в названии статьи микротрубочковый ток назван «Poleward Tubulin Flux», суть данного процесса описывается в ней вполне однозначно: «Особенно ярким проявлением динамики веретена является полюсной ток: минус-концевой поток субъединиц тубулина, осуществляющийся» благодаря микротрубочкам веретена и вызываемый

разборкой минус-концов микротрубочек (обращённых к полюсам веретена) и сборкой на их плюс-концах» (A particularly dramatic manifestation of spindle dynamics is poleward flux: the minus-end-directed flow of tubulin subunits through spindle microtubules, driven by the disassembly of microtubules at their minus ends (oriented toward the spindle poles) and assembly at their plus ends). Таким образом, использование машинного перевода в некоторых случаях может привести к появлению некорректных формулировок, которые могут ввести в заблуждение неподготовленного читателя.

Третье.

В разделе «Результаты» на страницах 89-90 фразы выстроены таким образом, что не совсем ясно, какие из перечисленных результатов касательно белка Mast на рисунке 21 были впервые получены автором, поскольку в конце абзаца идут ссылки на четыре зарубежные статьи. При этом предыдущий абзац, посвящённый белку Mei-38, составлен вполне корректно: на страницах 88-89 при описании рисунка 20 сначала изложены данные, полученные автором, а затем идёт фраза «Ранее прижизненная съёмка ... показала, что ... (Goshima, 2011)».

Следует отметить, что сделанные замечания несколько не умаляют качество проделанной работы и научную ценность полученных в ходе неё результатов. Резюмируя всё вышесказанное, можно заключить, что Поповой Ю.В. получены результаты высокой степени достоверности и новизны, которые являются приоритетными и оригинальными. Результаты данного исследования расширяют наши представления о механизмах формирования митотического веретена и о роли целого ряда белков в этом процессе. Полученные данные могут быть успешно использованы в учебном процессе высших учебных заведений. Текст работы является оригинальным, все приведённые данные изложены достаточно полно и снабжены всем необходимым иллюстративным материалом. Текст и содержание диссертации полностью соответствуют специальности 1.5.22. – клеточная биология. Материалы диссертации полностью отражены в опубликованных по теме диссертации четырёх статьях в рецензируемых журналах и девяти тезисах конференций.

По количеству и качеству обработанного материала, значению полученных научных результатов, уровню обобщения данных собственных исследований и сопоставления их с данными других авторов, диссертация Поповой Юлии Владимировны представляет собой законченную в рамках поставленной задачи фундаментальную работу, выполненную на самом высоком методическом уровне. Практическая значимость работы обусловлена возможностью применения полученных знаний в рамках критических технологий Российской Федерации, в частности, «Науки о жизни» и «Клеточные технологии». Результаты диссертации рекомендуются к

применению при чтении лекций в общих курсах клеточной биологии биологических факультетов университетов и медицинских ВУЗов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Поповой Юлии Владимировны является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научные достижения в области изучения процессов клеточного деления, что полностью соответствует п.9 Положения о порядке присуждения учёных степеней, утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, а диссертант заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология (биологические науки).

16 октября 2023 года

Старший научный сотрудник  
Научно-исследовательского института  
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова  
д.б.н.



А. В. Бураков

