

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию Поповой Юлии Владимировны

«Роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек веретена деления в культуре клеток S2 *Drosophila melanogaster*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. –клеточная биология (биологические науки).

Актуальность исследования. Клеточное деление и правильная сегрегация хромосом – фундаментальные процессы, лежащие в основе существования многоклеточных организмов. Знание процессов, происходящих при сборке митотического аппарата, отвечающего за правильное разделение хромосом по дочерним клеткам, важно как для понимания формирования многих заболеваний, например, синдрома Дауна, так и для поиска потенциальных мишеней для новых цитостатиков. Исследование формирования и роста микротрубочек – основного компонента веретена деления, затруднено тем, что, во-первых, большинство неполадок (например, мутации или снижение количество белка) имеют летальный фенотип и приводят к исчезновению объекта исследования, а во-вторых, процессы полимеризации/деполимеризации скоротечны, что значительно усложняет их детальный анализ. В результате, несмотря на многолетние исследования, до сих пор остаются открытыми некоторые вопросы регуляции динамики микротрубочек. Например, до сих пор нет единой теории инициации кинетохор-зависимого формирования микротрубочек веретена деления. Согласно модели Miato с соавторами (Miato et al., 2004), рост кинетохорных волокон начинается с генерации коротких, беспорядочно ориентированных микротрубочек вблизи кинетохор, плюс-концы которых захватываются кинетохорами. Согласно теории Mishra и коллег (Mishra et al., 2010), микротрубочки сначала закрепляются на кинетохорах минус-концами, образуя промежуточную структуру, которая затем разбирается. Таким образом, диссертационная работа Юлии Владимировны Поповой затрагивает сразу две актуальные темы – усовершенствование методов изучения процессов формирования микротрубочек веретена и выявление белков, регулирующих сборку веретена деления. В своей работе Юлия Владимировна исследовала роль пяти белков - Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в повторном росте микротрубочек в митозе культивируемых клеток S2 *D.melanogaster*.

Научная новизна и значимость работы состоит, в первую очередь, в усовершенствовании метода холодной деполимеризации микротрубочек. В работе впервые изучено влияние использования различных отрицательных температур (0, -1 или -2°C) на характер повторного роста микротрубочек в клетках S2 дрозофилы и показано, что при 0°C рост микротрубочек происходит в основном от хромосом и/или кинетохоров, а при понижении условий культивирования до -2°C – преимущественно от centrosом. Кроме того, Юлией Владимировной исследована динамика повторного роста микротрубочек при истощении целевых белков и установлено, что белки Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast по-разному влияют на характер роста микротрубочек после их деполимеризации. Также в работе была впервые проведена прижизненная локализация гибридных флуоресцентных белков Eb1-eGFP, Mars-eGFP, Mei-38-eGFP и Mast eGFP в процессе восстановления веретена деления.

Структура диссертации является классической и содержит все необходимые разделы: введение, обзор научной литературы, описание использованных материалов и методов исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы. Текст диссертации изложен на 135 страницах, содержит 13 таблиц, 28 рисунков и список использованных литературных источников из 252 наименований.

Материалы диссертации были представлены на 9 международных и российских конференциях в 2015-2019 гг., по ним в 2016-2022 гг. опубликовано 4 англоязычных статьи в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК, включая 2 статьи в высокорейтинговом журнале «Cells».

Глава «Обзор литературы» отражает все аспекты, необходимые для понимания темы диссертации. В разделе кратко охарактеризованы стадии клеточного цикла и митотического деления, приведены сведения о регуляции динамики формирования митотического веретена. Особое внимание уделено полимеризации/деполимеризации микротрубочек и методам изучения этого процесса. Раздел также содержит информацию об исследуемых в диссертационной работе белках и их ортологах. Отдельно хочется отметить последний раздел Обзора литературы – пункт 1.5 «Культивируемые клеточные линии *D. melanogaster*». На мой взгляд, весьма похвально, что автор описывает происхождение объекта исследования и заостряет внимание на его свойствах и ограничениях. Это свидетельствует о глубоком погружении Юлии Владимировны в тему работы и облегчает понимание тонкостей выполненной работы.

В главе «Материалы и методы» представлены все методы, которые были использованы автором в ходе выполнения диссертационной работы. Следует отметить разнообразие методов и подходов, использованных автором работы: это и обширный набор молекулярных методов, включая анализ экспрессии генов, РНК-интерференцию, и современная цитология, включая прижизненное окрашивание компонентов веретена деления и прямые исследования полимеризации микротрубочек после различных воздействий.

В главе «Результаты» изложены все полученные автором данные, которые подразделяются на 2 разные части: отработка методов изучения повторного роста микротрубочек после их деполимеризации и собственно анализ роли белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в полимеризации микротрубочек и формировании веретена деления в культуре клеток S2. Все приведенные результаты обильно и прекрасно иллюстрированы. Функции перечисленных белков в формировании веретена деления исследовались при помощи РНК-интерференции соответствующих генов. Оказалось, что максимальное влияние на полимеризацию кинетохорных микротрубочек имеет белок Mast, а наиболее слабое влияние – белок Non3. Дополнительно, Юлия Владимировна проанализировала колокализацию белков с компонентами веретена при помощи прижизненной микроскопии соответствующих GFP-меченых белков. Для белков Non3 и Eb1 это было сделано впервые. Практически все приведенные в разделе эксперименты сопровождаются количественными измерениями различных параметров. Достоверность полученных автором экспериментальных данных обеспечивается большим количеством проанализированного материала, достаточным количеством биологических повторов, а также соразмерными контролями. Все полученные данные были соответствующим образом нормированы и статистически обработаны для корректного сравнения результатов.

В главе «Обсуждение» Юлия Владимировна обсуждает деполимеризацию микротрубочек веретена деления в целом и участие белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек митозе культивируемых клеток S2. Из данной главы следует, что полученные автором результаты поддерживают модель кинетохор-зависимого формирования микротрубочек, предложенную в 2004 году Maiato с соавторами (Maiato et al., 2004).

Выводы данной диссертационной работы обоснованы, следуют из результатов и соответствуют поставленным задачам.

Замечания. Основные замечания, касающиеся работы, можно разделить на 2 группы: статистика и обсуждение результатов.

1. Удивительны отношения автора со статистической обработкой данных. С одной стороны, для всех количественных данных в таблицах приведены достоверности, и в каждом случае сделано достаточно биологических повторов и проанализировано множество материала. С другой стороны, в самом тексте диссертации слово «статистически» встречается всего 8 раз, из которых к результатам относится 3 раза, 2 из них – про белок Non3, и 1 – про белок Eb1. Слово «достоверно» встречается в тексте всего 2 раза, причем 1 раз – в описании методов, а второй раз – в результатах при описании Недостоверных значений для Non3. В остальных случаях в тексте упоминаются «существенные» и «значительные» отличия, причем одни и те же события в главах «Результаты» и «Обсуждение» могут рассматриваться с диаметрально противоположных позиций. Например (стр. 103), в обсуждении написано, что «длина ВД в клетках с РНК-и гена Eb1, mars, mei-38 или mast значительно меньше чем в контрольных клетках S2 дрозофилы», а в результатах - «РНК-и гена mei-38 или Eb1 приводит к небольшому уменьшению длины ВД по сравнению с контролем (11,92 мкм и 10,84 мкм, соответственно). РНК-и гена mast приводит к формированию короткого ВД (4,27 мкм).» Хотелось бы определиться, что автор считает значительным увеличением длины веретена, а что – небольшим?
2. Вызывает сомнение выбранный метод статистической обработки для оценки отличий в размере веретена деления (Рис.17) и размере астр (рис.28). Автором выбран U-критерий Манна - Уитни, в результате применения которого получилось, что достоверно отличаются (с *** $p < 0,001$) размеры веретена деления с очень близкими медианами (например, 14.05 мкм для контроля и 12.71 мкм для веретена после РНК-интерференции гена mars) и практически полностью перекрывающимися областями разброса («усами» на Рис.17). Кстати, на соответствующем рисунке в статье, опубликованной автором, достоверность указана уже как * $p < 0.05$ (Pорова et al., 2022). Аналогичная ситуация - для размера астральных микротрубочек на рис. 28.
3. В Таблице 11, где приведена частота повторного роста микротрубочек, для белка Non3 указана достоверность в различиях от контроля на 20 мин (81%

- клеток) и 75 минутах (98% клеток), хотя в тексте сформулировано корректно: «Снижение количества белка Non3 статистически значимо влияет на процесс кинетохор-зависимого формирования МТ только во временной точке 20 мин».
4. Вторая группа замечаний относится к обсуждению полученных результатов. Обсуждение неоднородное: большая часть написана очень сжато, «телеграфным стилем», часто пропущены логические причинно-следственные связи. И при этом очень тщательно и подробно, с возможными молекулярными механизмами влияния на сборку веретена деления, обсужден белок Non3. В итоге на белок Non3, который не влияет существенно на повторный рост микротрубочек, приходится целых 4 страницы подробного обсуждения, а на остальные 4 белка, которые значительно вовлечены в регуляцию процесса сборки веретена, в сумме приходится чуть более 2 страниц. В обсуждении белков Mast, Eb1, Mars и Mei-38 Юлия Владимировна больше внимания уделила описанию их ортологов, а не молекулярным механизмам регуляции полимеризации микротрубочек.
 5. Почему-то оказался не затронутым важный вопрос о длинах веретена. В обзоре литературы в разделе 1.5 «Культивируемые клеточные линии *D. melanogaster*» автор отмечал, что культивируемые S2 клетки в диаметре имеют 5-11 мкм. Промета- и метафазное веретено, как правило, длиной не превышает диаметра ядра (это связано с механизмом расхождения центриолей). При этом, в главе «Результаты» размер веретена деления в контрольных клетках S2 составлял 14.05 мкм, тогда как в работах других авторов длины метафазных веретен составляли 9.0 ± 1.3 мкм (Morales-Mulia et al., 2005, doi: 10.1091/mbc.e04-12-1110), 8.6 ± 1.7 мкм (de Lartigue et al., 2011, doi: 10.1186/1747-1028-6-8) и т.п. К сожалению, именно эти данные не были сопоставлены с другими и никак не обсуждены в работе.

Замечания к стилю изложения работы:

6. В тексте неоднократно встречаются некорректно сформулированные причинно-следственные связи. Например, в главе «Обсуждение» несколько раз в завершении смысловых блоков сделано заключение, что белки выполняют функции по сборке и регуляции стабильности кинетохорных микротрубочек так как они колокализуются с кинетохорными микротрубочками. Одной колокализации недостаточно для вывода о функциях, однако автор упорно опускает факты о нарушениях роста микротрубочек после РНК-интерференции

генов, кодирующих упомянутые белки. Аналогичная ситуация – в Выводе №5, который сформулирован так, что создается впечатление, что автор делает вывод о функциях на основе одной колокализации. Необходимо отметить, что это замечание касается исключительно корректности формулировок, в совокупности результаты действительно позволяют делать такие выводы.

7. Также в тексте диссертации неоднократно встречаются другие неудачные выражения: «Синтез дцРНК осуществляли ...согласно прилагаемым фирменным протоколам», «Примечательно, что мы отметили, что...», «особую генетическую устойчивость процесса формирования микротрубочек», «зарождение микротрубочек», «под контролем многих генов, которые, по крайней мере, частично функционально избыточны» и т.д.
8. В тексте встречается небольшое количество опечаток, несоответствия падежей, двойные скобки, в подписи к Рис.9 нет значений масштаба.

Тем не менее, следует отметить, что подавляющее большинство замечаний относится к вариативной части диссертации, либо касаются формулировок и не снижают очевидные достоинства данной работы.

Заключение. В целом, диссертация Юлии Владимировны Поповой представляет законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком научном уровне. Очевидным достоинством данной работы является использование разных независимых способов и методик и множественные количественные измерения для анализа каждого исследуемого аспекта. Для каждого из белков автором проанализированы морфология веретена деления после нокдауна соответствующих генов, а также проведены прямые эксперименты по поляризации микротрубочек после их холодной или колцемидной обработки в условиях дефицита исследуемых белков. Научные положения, выносимые на защиту, и выводы обоснованы и соответствуют содержанию работы. Автореферат и опубликованные статьи полностью отражают содержание диссертации. Результаты, полученные автором в ходе выполнения данной работы, расширяют фундаментальные знания о митотическом веретене. Кроме того, при выполнении данной работы был усовершенствован и апробирован простой элегантный метод изучения повторного роста микротрубочек после холодной обработки, который может быть интересен другим исследователям.

Считаю, что диссертационная работа Поповой Юлии Владимировны соответствует требованиям, установленным в пп. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24 сент. 2013 г. N 842), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология (биологические науки).

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник ФГБНУ

«Федеральный исследовательский центр

Институт цитологии и генетики СО РАН»

Кандидат биологических наук (03.02.07 – Генетика),



Фёдорова Светлана Александровна

12.10.2023

Адрес места работы:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10

Телефон: +7(383) 363-49-80

Факс:+7(383) 333-12-78

E-mail: fsveta@bionet.nsc.ru

Подпись к.б.н. Фёдоровой С.А. заверяю

Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН, в.о.н.

12.10.2023



Г.В. Орлова