ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Разуваевой Алены Викторовны
на тему «Роль белков Asp и Patronin в процессе кинетохор-зависимого формирования 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 (Д 003.011.01)
на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»

Формирование веретена деления является основной, и по всей видимости, базальной, т.е. исходной и наиболее древней функцией микротрубочек. Ряд одноклеточных эукариот и некоторые клетки эволюционно древних многоклеточных эукариотических организмов могут не иметь микротрубочек в интерфазе. Однако процесс деления эукариотической клетки без них невозможен, и так называемый закрытый митоз не является исключением. Поскольку корректное построение веретена деления является необходимым условием обеспечения стабильности генома, неудивительно наличие в клетках механизмов «подстраховки» этого процесса. Так, хорошо известно, что при сборке веретена деления нуклеация микротрубочек может происходить как на центросомах в полюсах веретена, так и на кинетохорах или на предсуществующих микротрубочках. Наличие нескольких независимых способов нуклеации микротрубочек делает сборку веретена деления более надежной и устойчивой к повреждениям. При этом нуклеация микротрубочек лишь на кинетохорах является необходимой и достаточной для сборки функционального веретена деления. Информации о молекулярных участниках процесса кинетохор-зависимого роста микротрубочек в настоящее время недостаточно для построения полной картины данного процесса. Предметом исследования данной диссертационной работы явилось выяснение, участвуют ли белки Asp/ASPM и Patronin/CAMSAP в процессе кинетохор-зависимого роста микротрубочек. Ранее было известно, что оба этих белка являются высоко консервативными и снижение их количества или отсутствие у

млекопитающих приводит к серьёзным аномалиям развития, а также что нарушение функции кодирующих их генов у дрозофилы приводит к митотическим фенотипам, позволяющим предполагать их участие в данном процессе. Можно утверждать, что изучение молекулярных механизмов формирования митотического веретена, и в частности, роли белков Asp и Patronin в кинетохор-зависимом росте микротрубочек веретена деления, является ***актуальной фундаментальной научной задачей***, важность решения которой трудно переоценить.

Для детального изучения роли белков Asp и Patronin в этом процессе в данной работе было выбрано сочетание методов РНК-интерференции и повторного роста микротрубочек, т.е. их восстановления после деполимеризации тубулина колцемидом, который блокирует центросом-зависимый рост микротрубочек. Использование в ходе исследования трансгенных линий клеток, нарабатывающих химерные белки Asp-eGFP и Patronin-eGFP, позволило проанализировать локализацию изучаемых белков в данном процессе. В ходе исследований автором были получены ***новые и приоритетные научные результаты.*** А именно, впервые была изучена роль белков Asp и Patronin в процессе кинетохор-зависимого роста микротрубочек, и показано, что их действие различно: белок Asp не принимает участие в нуклеации вблизи кинетохоров и подавляет рост вновь сформированных микротрубочек, а белок Patronin, наоборот, участвует в стабилизации новых микротрубочек, образующихся вблизи кинетохоров, но не оказывает значительного влияния на скорость роста вновь образованных микротрубочек. В представленной работе впервые была проанализирована локализация химерного белка Asp-eGFP во время кинетохор-зависимого формирования веретена деления в клетках S2 *Drosophila melanogaster*. Методом повторного формирования веретена деления после отмывки колцемида было установлено, что белок Asp-eGFP локализуется на кинетохорах на самых ранних этапах кинетохор-зависимого формирования микротрубочек, а на последующих этапах он связывается с минус-концами микротрубочек и сшивает их между собой с образованием астро-подобных структур, что говорит о роли данного белка в фокусировке микротрубочек на всех этапах формирования веретена деления. В данной работе была уточнена локализация белка Patronin на протяжении клеточного цикла в клетках S2, при этом особое внимание уделено локализации данного белка в митозе на стадии прометафазы. Впервые было продемонстрировано прижизненно и на фиксированных

препаратах клеток, что в митозе на стадии прометафазы Patronin-eGFP связывается с кинетохорными волокнами. Была проанализирована локализация химерного белка Patronin-eGFP при кинетохор-зависим формировании веретена деления в клетках S2 и впервые показано, что он связывается с микротрубочками, образованными от кинетохоров, на более поздних стадиях сборки веретена, когда микротрубочки сформировали длинные пучки. Таким образом, Patronin-eGFP демонстрирует динамическое связывание с микротрубочками веретена деления, перемещаясь от одной популяции микротрубочек к другой в зависимости от фазы митоза.

Диссертационная работа построена по традиционному принципу. В самом начале на стр. 5 приводится подробный список используемых сокращений и аббревиатур, что очень облегчает восприятие материала, особенно при чтении обзора литературы. Собственно текст диссертации открывается главой «Введение», в которой рассмотрена актуальность работы, затем ясно и чётко 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 по теме работы и её личном вкладе в выполнение исследований, а также описаны структура и объём работы и приведены благодарности.

Глава 1, «Обзор литературы», хорошо структурирована и для удобства прочтения разбита на разделы вплоть до подразделов третьего порядка. В ней приведены общие понятия о митозе, строении веретена деления и всех его компонентах; затем идут сведения о путях нуклеации микротрубочек во время митоза и о взаимодействии различных путей нуклеации микротрубочек при формировании веретена деления. Затем изложены сведения о белковых факторах, способствующих сборке веретена деления и приведены характеристики целевых белков Asp/ASPM и Patronin/CAMSAP. Все данные, приведённые в обзоре литературы, затем обобщены в подразделе «Заключение».

В главе 2, «Материалы и методы», очень подробно и тщательно описаны все использованные в ходе работы над диссертацией методы исследования, а также приведены списки использованных растворов, культуральных сред, бактериальных штаммов и клеточных линий. Разуваева А.В. в своей работе применяла широкий спектр самых современных цитологических и молекулярно-биологических методов,

включая методы ПЦР – обычной и количественной с детекцией результатов в режиме реального времени, молекулярного клонирования, РНК-интерференции, разборки/восстановления микротрубочек веретена деления колцемидом, методы эпифлуоресцентной и конфокальной микроскопии, а также методики измерения количественных параметров клеток на их микрофотографиях и статистической обработки данных.

Следует особо подчеркнуть трудоёмкость ряда использованных методик, в частности восстановления микротрубочек веретена, когда в отличие от классических экспериментов по восстановлению интерфазных микротрубочек в клетках адгезионных культур, автору приходилось проводить серию центрифугирований и затем использовать жидкий азот для фиксации клеток на стекле для последующей микроскопии. Надо также отметить тщательность автора при описании всех перечисляемых методов. Исследователь, желающий воспроизвести описанные в работе эксперименты, без труда может сделать это после ознакомления с текстом диссертации. Это лишний раз подчёркивает ***степень личного участия автора работы*** в постановке и осуществлении описанных в диссертации экспериментов, а именно самостоятельного получения специфичных к исследуемым генам двуцепочечных РНК, культивировании клеточных линий S2 дрозофилы, проведения РНК-интерференции, деполимеризации микротрубочек колцемидом, индукции синтеза химерных белков в трансгенных клеточных линиях, приготовлении цитологических препаратов с их последующим иммуноокрашиванием, эпифлуоресцентной и конфокальной микроскопии препаратов, а также обработке и анализу полученных результатов.

В главе 3 «Результаты» последовательно и подробно изложены полученные Разуваевой А.В. в ходе проведения исследований новые данные, в частности, о локализации белков Asp и Patronin в клеточном цикле, их роли в кинетохор-зависимом росте микротрубочек, и о внутриклеточной локализации химерных белков Asp-eGFP и Patronin-eGFP в ходе восстановления веретена деления. Следует отметить, что глава «Результаты», так же как и весь текст диссертации в целом, очень хорошо выверен и легко читается; весь текст снабжён большим количеством очень качественного иллюстративного материала. В общей сложности диссертационная работа изложена на 117 страницах и содержит 36 рисунков и 5 таблиц; список литературы включает 205 наименований источников. Приведённые в диссертационной работе авторские

иллюстрации исключительно высокого качества, все рисунки снабжены точными и исчерпывающими описаниями.

Работа завершается главой 4, в которой обсуждаются полученные экспериментальные данные, и приводится предложенная автором модель кинетохор-управляемого роста микротрубочек в клетках S2, снабжённая соответствующей схемой; после этого следуют корректные и чётко сформулированные выводы.

Текст работы тщательно выверен, не содержит ошибок и опечаток, и по оформлению диссертации, также как по существу проделанной работы, замечаний практически нет. В качестве нескольких незначительных можно упомянуть следующие:

- На рисунке 14 на стр. 62 показаны тремя отдельными панелями локализация ДНК, белка Asp-eGFP и фибрилларина, при этом на панели «наложение» присутствуют два цветовых канала из трёх. Если визуализация одного из каналов на суммированном изображении не нужна, корректнее просто перечислить в надписи на рисунке использованные каналы, как это сделано на рис. 18 на стр. 65; или же приводить на панели «наложение» все имеющиеся каналы, как это сделано на остальных рисунках.

- На стр. 17 при описании динамической нестабильности микротрубочек второй из двух соответствующих терминов (catastrophe и rescue) был переведён с английского на русский язык как «восстановление», в то время как в русскоязычной литературе общепринятым является буквальный перевод – «спасение». В контексте описания микротрубочек термин «восстановление» обычно применяется при описании экспериментов с повторным ростом микротрубочек от соответствующих сайтов нуклеации после их предварительной деполимеризации различными способами.

- На стр. 27 при перечислении модельных животных корректнее использовать для всех одновременно либо обиходные, либо видовые названия, а не вперемешку.

- На стр. 78 при описании результатов, несколько некорректно сформулировано предложение: «Эти сигналы тубулина затем

увеличивались, формируя пучки тубулина и тубулиновые агрегаты…». Наверное, корректнее было бы написать нечто вроде: «Эти сигналы тубулина затем увеличивались, что служит индикатором формирования пучков тубулина и тубулиновых агрегатов…»

Следует отметить, что сделанные незначительные замечания нисколько не умаляют качество проделанной работы и высокую научную ценность полученных в ходе неё результатов. Резюмируя всё вышесказанное, можно заключить, что Разуваевой А. В. самостоятельно получены результаты высокой степени достоверности и новизны, которые при этом являются приоритетными и оригинальными. Результаты данного исследования расширяют наши представления о механизмах формирования митотического веретена и о роли двух минус-концевых белков микротрубочек в этом процессе. Конкретнее, в диссертационной работе было убедительно продемонстрировано, что белки Asp и Patronin участвуют в процессе кинетохор-зависимого роста микротрубочек во время митоза клеток S2 дрозофилы: белок Asp необходим для фокусировки минус-концов микротрубочек с самых ранних стадий их формирования вблизи хромосом, а белок Patronin – для стабилизации минус-концов микротрубочек, начиная со стадии прометафазы. В целом, результаты данной работы расширяют список молекулярных участников процесса кинетохор-зависимой нуклеации микротрубочек, а также позволяют углубить понимание механики самого процесса кинетохор-зависимого роста микротрубочек. Поскольку изучаемые белки являются эволюционно высококонсервативными, полученные данные способствуют формированию более полного представления о протекании митоза у эукариотических клеток.

Полученные данные могут быть успешно использованы в учебном процессе высших учебных заведений. Текст работы является оригинальным, все приведённые данные изложены 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 трёх статьях в высокорейтинговых рецензируемых журналах и семи тезисах международных конференций.

По количеству и качеству обработанного материала, значению полученных научных результатов, уровню обобщения данных собственных исследований и сопоставления их с данными других авторов, диссертация Разуваевой Алены Викторовны представляет собой законченную в рамках поставленной задачи фундаментальную работу, выполненную на очень 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 Разуваевой Алены Викторовны 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).

26 февраля 2026 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

ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
ЗАВ КАНЦЕЛЯРИЕЙ
НИ СИДОРОВА