

Отзыв официального оппонента
на диссертацию Разуваевой Алены Викторовны «Роль белков Asp и Patronin в процессе
кинетохор-зависимого формирования микротрубочек веретена деления в культуре
клеток S2 *Drosophila melanogaster*»,
представленную на соискание степени ученой степени кандидата наук
по специальности 1.5.22. – Клеточная биология

Митоз – один из ключевых процессов клетки, связанный с воспроизводством генетического материала, и имеющаяся на данный момент экспериментальная база позволяет говорить о чрезвычайно сложной системе регуляции расхождения хромосом, со множеством молекулярных участников и точек контроля качества этого процесса. С другой стороны, клетки часто реализуют стратегию «выживания любой ценой», что при наличии определенных повреждений компонентов митотической машинерии приводит к развитию тяжелых патологий. Очевидно, что главная фаза митоза, связанная с формированием веретена деления, является предметом самого пристального изучения, и понимание роли отдельных компонентов больших регуляторных комплексов необходим для понимания работы всей системы.

Диссертация А.В. Разуваевой посвящена анализу одного из наименее изученных механизмов формирования веретена деления хромосом, инициируемого кинетохорами, и роли в этом процессе двух высококонсервативных связанных с веретеном деления белков – Asp и Patronin, на модели культивируемых клеток дрозофилы. Интерес именно к этим белкам автор обосновывает тем, что, во-первых, несмотря на относительную простоту организации регуляторных комплексов веретена деления у мух по сравнению с млекопитающими эти белки присутствуют у всех эукариот, а также тем, что нарушения функции генов этих белков вызывает к жизни фенотипы, предполагающие их участие в росте микротрубочек веретена деления, зависимых от кинетохор, однако точные функции обоих белков до конца неясны. Очевидно, что тема диссертации весьма актуальна.

Работа построена по традиционному образцу, и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методик, результаты, их обсуждение и выводы.

Во Введении диссертант кратко обосновывает как выбор белков, так и модели для изучения их функций, концентрируясь именно на кинетохор-зависимом механизме. Обзор литературы содержит ссылки на 205 работ. На основании этих данных автор описывает современные представления о фазах митоза, организации веретена деления, о взаимодействующих с микротрубочками белках, структуре их комплексов и предполагаемой функции, а также все 3 существующие гипотезы о механизмах инициации и поддержания архитектуры тубулинового аппарата веретена деления. Обзор, как и вся работа, написан хорошим языком и читается с большим интересом. Особую благодарность автору следует высказать за предваряющий текст список используемых сокращений, что существенно облегчает восприятие материала.

Раздел «Материалы и методы» представляет широкий спектр использованных современных подходов – от культивирования клеток до ПЦР-анализа, экспрессии в клетках белков, слитых с флуоресцентными белками, РНК-интерференции и методов оптической микроскопии. Хочется отметить два момента. Во-первых, автор применяет подход с усилением флуоресцентного сигнала от продуктов генетических конструкций белков интереса, слитых с GFP, используя «сэндвич» с флуоресцентно-мечеными антителами к GFP, что увеличивает чувствительность метода при выявлении белков в локациях с их невысокими концентрациями. Во-вторых, диссертант уделяет большое внимание подбору уровней экспрессии исследуемых белков, слитых с флуоресцентными белками, и доказательству отсутствия влияния экспрессии меток на баланс полимеризованного и неполимеризованного тубулина, что фактически верифицирует полученные таким способом результаты и делает достоверными результаты прижизненной съемки. Также на решение поставленных задач работает сочетание анализа фиксированных клеток и живых.

В главе «Результаты» А.В. Разуваева подробно описывает полученные результаты, вкратце сводящиеся к следующему. Показано, что химерный белок Asp-GFP с прометафазы до анафазы локализуется на полюсах веретена деления (ВД), а в телофазе перемещается на центральное ВД. В интерфазе же Asp-GFP- выявляется в ядре, но отсутствует в ядрышке, что показано впервые. Автор обсуждает, какую роль этот белок может выполнять в интерфазе. В принципе, в последние годы накапливаются данные о весьма экономном использовании клетками своих белковых запасов, и автор приводит ряд таких примеров в Обсуждении. Далее также подробно исследована локализацию белка Patronin во всех фазах митоза, а ее вариабельность на стадии прометафазы относится на счет одновременной реализацией нескольких способов нуклеации МТ ВД. Оценка скорости роста МТ, ассоциированных с Patronin-eGFP, позволяет автору предположить, что такое удлинение происходит за счет тредмиллинга. Диссертант приходит к выводу, что этот белок связывается с минус-концами МТ в прометафазных пучках и либо стабилизирует их, либо даже способствует полимеризации. Показано, что в интерфазе этот белок ко-локализуется с радиальными МТ. Основной вывод этой части исследования говорит о том, что Asp и Patronin связываются с разными, неперекрывающимися участками тубулиновых структур на протяжении всего клеточного цикла.

Чтобы выявить роль белков интереса в регуляции ВД, А.В. Разуваева провела эксперименты по РНК интерференции с целью снижения уровня транскриптов как каждого белка, так и двух одновременно, и оценила влияние таких манипуляций на митотический фенотип клеток линии S2. При подавлении экспрессии гена *asp* было выявлено накопление клеток в метафазе и удлинение ВД, а также формирование нетипичных полюсов. При подавлении экспрессии гена *Patronin*, напротив, выявлено укорочение ВД, что может свидетельствовать о участии продукта этого гена в стабилизации минус-концов МТ. При двойной РНК интерференции клетки демонстрировали комбинации фенотипов ВД, типичных

для подавления экспрессии каждого белка, что предполагает независимые друг от друга роли в регуляции ВД.

Далее диссертант исследовал роль кинетохор-зависимого роста МТ, используя прием деполимеризации ВД колцемином с последующей отмывкой и восстановлением МТ, которые в этом случае нуклеируются на кинетохорах. Использование клеток, экспрессирующих слитый с GFP тубулин, показало отсутствие влияния на функциональность таким образом восстановленного веретена деления, что также продемонстрировано впервые. Интересно, что автор на основе результатов РНК интерференции обоих генов, приходит к выводу о генетической устойчивости кинетохор-зависимого роста, возможно, за счет участия в его обеспечении продуктов многих генов.

Обсуждение результатов проведено на высоком уровне, обобщает собственные результаты и данные литературы. На этой основе диссертант предлагает модель, в соответствии с которой белок Asp закоривает минус-концы МТ, связанных с кинетохорами, и далее формирует пучки, тогда как Patronin стабилизирует эти МТ, и этот процесс наблюдается на протяжении всего роста МТ от кинетохор до формирования полноценного ВД.

Материал достаточно полно представлен в опубликованных работах. Выводы обоснованы и вытекают из представленных результатов исследования. Результаты работы достаточно полно отражены в автореферате и в 3 статьях, опубликованных в рецензируемых периодических изданиях, индексируемых в Scopus и WoS.

Принципиальных замечаний по работе нет – она очень четкая, методически выверенная и логичная. В порядке дискуссии хотелось бы узнать мнение Алены Викторовны по следующему вопросу:

во многих работах по анализу ядерных белков с помощью масс-спектрометрии выявляется тубулин с довольно приличным скором. Как Вы считаете, это артефакт или такой «внутриядерный» тубулин может работать до полной разборки ядерной оболочки на ранних стадиях хроматин-опосредованного пути сборки веретена деления?

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать заключение, что А.В. Разуваева успешно решила поставленные перед ней задачи и при этом проявила себя как высококвалифицированный специалист, владеющий широким арсеналом современных методов исследования в области клеточной биологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа А.В. Разуваевой «Роль белков Asp и Patronin в процессе кинетохор-зависимого формирования микротрубочек веретена деления в культуре клеток S2 *Drosophila melanogaster*» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной автором самостоятельно на высоком научном и методическом уровне, имеет значительную степень новизны. В диссертации содержится решение задачи, важной для понимания механизмов формирования митотического веретена деления. Полученные данные

могут быть рекомендованы к использованию в соответствующих курсах, читаемых на биологических факультетах университетов и в медицинских вузах. Диссертация полностью соответствует требованиям п.9 -14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции от 16.10.2024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.22. – Клеточная биология

Главный научный сотрудник,
руководитель лаборатории динамики внутриклеточных мембран Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии
наук,
доктор биологических наук
по специальности 03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология), профессор

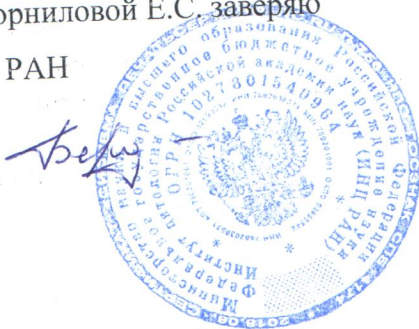
Корнилова Елена Сергеевна

Подпись д.б.н., проф. Корниловой Е.С. заверяю

Ученый секретарь ИНЦ РАН

К.б.н. Бердиева М.А.

26.02.2026



Полное название организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)

Почтовый адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект 4.

Телефон ИНЦ РАН: +7 (812) 297-18-29,

факс: +7 (812) 297-18-34

Адрес электронной почты ИНЦ РАН: cellbio@incras.ru

Сайт организации: <https://www.incras.ru/>