



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук
(ЦТП ФХФ РАН)
109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30
ОГРН: 1037736008727 ИНН: 7736194781
Тел. 8 (495) 678-31-16; e-mail: info@ctppcp.ru

исх. № 2/1-26(УС)

г. Москва

УТВЕРЖДАЮ

Директор ЦТП ФХФ РАН,

 М.А. Пантелеев



ОТЗЫВ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук о научно-практической значимости диссертации 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.

Актуальность темы исследования

Митотическое деление является ключевым по значимости биологическим процессом, во время которого клетка создает свою копию, прецизионно распределяя предварительно удвоенные хромосомы по формирующимся дочерним клеткам. Для решения этой задачи клетка полагается на веретено деления - специализированный аппарат, построенный из микротрубочек. Известно несколько путей сборки веретена деления во время митоза, но до сих пор не до конца ясно, каким образом они слаженно сочетаются и какую роль в процессе сборки веретена играет ряд митотических белков.

Диссертация Разуваевой Алены Викторовны посвящена выяснению роли двух конкретных белков, Asp и Patronin, в процессе формирования веретена по одному из известных путей его сборки - так называемому кинетохор-зависимому пути. Этот вариант сборки веретена деления подразумевает, что микротрубочки встраиваются в веретено деления, начиная формироваться не от полюсов веретена, а от хромосом (точнее, от ассоциированных с ними кинетохоров - крупных белковых комплексов, опосредующих взаимодействие хромосом с микротрубочками).

В качестве экспериментальной модели в диссертационной работе используются клетки S2 *Drosophila melanogaster*. Выбор белков Asp и Patronin в качестве объектов исследования обоснован известной ассоциацией этих белков или их человеческих ортологов (ASPM и CAMSAP, соответственно) с минус-концами микротрубочек - то есть с зонами, которые, как правило, отвечают за организацию сети микротрубочек в клетках.

Тематика работы актуальна, поскольку кинетохор-зависимый путь построения веретена недостаточно подробно изучен, и понимание роли конкретных митотических белков в этом процессе могло бы позволить лучше понять механизмы клеточного деления, а с практической точки зрения - пролить свет на возможные уязвимости данного процесса, приводящие к ошибкам митотического деления.

Научная новизна исследования

В диссертации Разуваевой Алены Викторовны впервые исследована роль белков Asp и Patronin в реализации кинетохор-зависимого пути построения веретена деления. Уточнена локализация белка Patronin и Asp в ходе всего клеточного цикла в клетках S2, а в частности, продемонстрировано, что Asp-eGFP в митозе связан с минус-концами микротрубочек на полюсах веретена деления с прометафазы и до телофазы, а в интерфазе белок Asp-eGFP находится в ядре, за исключением зоны плотного фибриллярного компонента ядрышка; Patronin-eGFP в интерфазе и на стадии профазы митоза локализован на пучках микротрубочек разной длины, во время прометафазы Patronin-eGFP перераспределяется на минус-концы кинетохорных волокон и остаётся связанным с ними вплоть до телофазы. Таким образом, продемонстрировано, что белки Asp и Patronin функционируют независимо друг от друга, связываясь с минус-концами микротрубочек разных классов и на разных стадиях клеточного цикла.

Достоверность научных результатов

Результаты диссертации Разуваевой Алены Викторовны получены на современном оборудовании согласно ранее апробированным методикам. Основные результаты верифицированы двумя различными методиками визуализации клеток (путем прижизненной микроскопии и с помощью окрашивания фиксированных клеток антителами). Полученные данные обработаны методами математической статистики.

Значимость полученных результатов

В работе выполнены исследования, позволившие прояснить роль двух белков дрозофилы, Asp и Patronin, ассоциированных с минус-концами микротрубочек, в процессе построения веретена деления по кинетохор-зависимому пути, что является важным вкладом в воссоздании молекулярной картины митотического деления клеток. Поскольку исследуемые белки и механизмы организации микротрубочек в значительной степени консервативны у эукариот, полученные результаты могут быть важны для

понимания митотических процессов и в других модельных системах, включая клетки позвоночных. Расширение представлений о протекании митоза может иметь значение для изучения причин ошибок сегрегации хромосом и геномной нестабильности, связанных с различными заболеваниями, включая онкологические.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты и выводы диссертации могут быть востребованы в научных учреждениях, выполняющих фундаментальные исследования в области клеточной биологии и биологии развития. К таким организациям относятся, например, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Институт цитологии РАН, Институт биологии гена РАН, НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ и другие научные учреждения.

Количество печатных работ

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в международную базу данных Scopus, 7 тезисов в материалах российских и международных конференций. Содержание опубликованных автором оригинальных работ полностью отражает основные положения диссертации.

Содержание диссертации

Диссертационная работа Разуваевой Алены Викторовны имеет классическую структуру и состоит из оглавления, списка сокращений, введения, литературного обзора, глав «Материалов и методы», «Результаты», «Обсуждение», выводов и списка цитированной литературы, содержащего 205 наименований. Работа изложена на 117 страницах, содержит 36 рисунков, 5 таблиц.

Во введении автор раскрывает актуальность темы исследования, формулирует цели и задачи диссертационной работы, обосновывает научную новизну и практическую значимость работы. Цель логично вытекает из

обозначенной проблематики и описания состояния разработанности тематики.

После введения в работе представлен интересный обзор литературы, в котором сначала описано строение веретена деления и его составных компонентов – микротрубочек, центросом и кинетохоров устройство чекпоинта (контрольной точки) сборки веретена деления. Важным элементом литературного обзора является описание различных путей нуклеации микротрубочек и их взаимодействия во время формирования митотического веретена деления. В конце обзора приведены сведения об исследуемых белках Asp и Patronin, позволяющие оценить степень исследованности тематики.

В разделе «Материалы и методы» В разделе «Материалы и методы» диссертации описаны используемые экспериментальные системы и методики исследований, примененные для изучения роли белков Asp и Patronin в формировании митотического веретена в клетках *S2 Drosophila melanogaster*. В частности, приведены сведения о примененных молекулярно-биологических методах (ПЦР, гель-электрофорез, клонирование, секвенирование, получение двуцепочечной РНК и проведение РНК-интерференции), методах работы с клеточными культурами дрозофилы (культивирование клеток S2, индукция экспрессии трансгенов, обработка клеток колцемидом), а также о способах получения трансгенных клеточных линий, экспрессирующих химерные белки Asp-eGFP и Patronin-eGFP. Описаны методы флуоресцентной и конфокальной микроскопии, подготовки цитологических препаратов, количественного анализа микроскопических изображений (измерение параметров веретена деления и интенсивности флуоресцентного сигнала) и примененных статистических методов обработки данных.

Далее описаны основные результаты исследования. Отдельная глава посвящена обсуждению результатов, в которой представлена интерпретация полученных результатов и их сравнение с имеющимися данными мирового

научного сообщества и предложена итоговая модель участия белков Asp и Patronin в формировании веретена деления по кинетохор-зависимому пути.

По результатам работы сформулировано 6 выводов, которые в целом соответствуют поставленной цели диссертационного исследования. Список литературы включает 205 литературных источников. Представленная диссертационная работа является законченным научно-исследовательским трудом и выполнена на высоком экспериментальном уровне.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК. В целом диссертационная работа является важным и оригинальным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. Несомненным достоинством работы является чётко поставленная цель, которую автор методично и последовательно достигает в серии проведённых экспериментов. Так что всё проведённое исследование выглядит цельно, логично и обоснованно.

Работа впервые детально устанавливает распределение белков Patronin и Asp в клетке на всех стадиях клеточного цикла. Понимание того, где и когда каждый белок функционирует, первостепенно для определения роли данных белков в клетке. Автор диссертации, однако, не останавливается на этом, а использует достаточно уникальный эксперимент по возобновлению роста микротрубочек после обработки колцемидом, что позволяет избирательно заблокировать рост центросомальных микротрубочек. Этот оригинальный подход хорошо подходит для исследования именно кинетохор-зависимого пути сборки микротрубочек. В совокупности с исследованием локализации белков в клеточном цикле наблюдение формирования веретена деления по кинетохор-зависимому пути позволяет установить очень разные роли двух минус-концевых белков - Asp и Patronin.

Таким образом, выбранные методы выглядят полностью адекватными поставленной цели. Работа выполнена на высоком техническом и методическом уровне: из диссертационной работы видно, что автор прекрасно владеет и понимает тонкости и ограничения методов молекулярной биологии и работы с клеточными культурами, достаточно критично и осторожно интерпретирует собственные данные, что, несомненно, добавляет доверия к полученным результатам. Так, например, при использовании методов РНК-интерференции используется терминология «истощение белка» или «снижение уровня транскриптов соответствующих генов методом РНК-и», что дает понять читателю, что диссертант понимает ограничения методик, допускает неполное подавление экспрессии исследуемых белков и сохраняет научную строгость в описании выполнения экспериментов.

Несмотря на достоинства, работа не лишена некоторых недостатков, которые не умаляют её общей значимости.

1. Результаты многих наблюдений, сделанных в диссертационной работе, представлены в виде конкретного примера визуализации одной клетки. Поскольку не приводится вся совокупность клеток, которые на самом деле наблюдались, не ясно, насколько результат воспроизводится на разных клетках и в разные экспериментальные дни, и вообще - сколько клеток было проанализировано и сколько было выполнено независимых повторов экспериментов. В этом смысле в ряде случаев не хватает какой-то интегральной количественной статистики наблюдаемых характеристик клеток по всем проведенным экспериментам. Это замечание относится, например, к документации и анализу результатов локализации белка Patronin-eGFP (рис. 17–20).
2. В диссертационной работе клеточное распределение белков Asp и Patronin анализируется на основе химерных вариантов: Asp-eGFP и Patronin-eGFP, при этом эндогенные (немеченные) белки сохраняются в клетке. В связи с этим возникает вопрос, не может ли повышенная

концентрация белков в клетках влиять на наблюдаемое поведение белков. Насколько гетерогенной была экспрессия трансгенов? Могут ли добавленные метки eGFP оказывать какие-то эффекты на локализацию белков?

3. В некоторых случаях не до конца ясны детали применения статистических методов. Например, на рис. 26 отложены столбцы без указания погрешностей измерения. Неясно, усреднялись ли разные повторы независимых экспериментов, анализировался отдельный «репрезентативный» эксперимент или использовался иной подход.

4. Среди немногочисленных обнаруженных в диссертации неточностей, которые обратили на себя внимание, можно отметить опечатку на странице 97: указано, что моторный белок CENP-E движется к минус-концу микротрубочек, тогда как известно, что это плюс-направленный моторный белок.

5. Не совсем понятна формулировка вывода № 4: «белок Asp не принимает участие в нуклеации микротрубочек вблизи кинетохоров, но подавляет их полимеризацию» Почему эти два утверждения противопоставляются здесь союзом «но»? Ожидается ли, по мнению автора, что белок, который принимает участие в нуклеации будет подавлять полимеризацию микротрубочек или наоборот?

Заключение

Диссертация «Роль белков Asp и Patronin в процессе кинетохор-зависимого формирования микротрубочек веретена деления в культуре клеток *S2 Drosophila melanogaster*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, имеющей существенное научное и практическое значение для глобальной проблемы антибиотикорезистентности.

По своей актуальности, научной новизне и научно-практической значимости диссертация Разуваевой Алены Викторовны «Роль белков Asp и

Patronin в процессе кинетохор-зависимого формирования микротрубочек веретена деления в культуре клеток S2 *Drosophila melanogaster*» соответствует требованиям пунктов 9–14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в текущей редакции), а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 клеточная биология.

Отзыв на диссертацию Разуваевой Алены Викторовны обсужден на заседании ученого совета федерального государственного бюджетного учреждения науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (протокол № 1 от «25» февраля 2026 г.).

Зав.лаб. биофизики цитоскелета

Доктор физ.-мат. наук



Гудимчук Никита Борисович

Адрес: 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30

Email: Info@ctrprcr.ru Тел.: 8 (495) 678-31-16

Подпись д.ф.-м.н., Гудимчука Н.Б. удостоверяю

Ученый секретарь

Федерального государственного

бюджетного учреждения науки

Центра теоретических проблем

физико-химической фармакологии РАН



Овсебян Р.А.