

Отзыв официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук
Анисимова Михаила Николаевича
на тему: «Механизмы динамики микротрубочек и её регуляции
низкомолекулярными ингибиторами»
по специальности 1.5.2 – Биофизика

Микротрубочки, наряду с актиновыми микрофиламентами и промежуточными филаментами, являются элементами цитоскелета. При этом микротрубочки являются обязательным компонентом любой эукариотической клетки – ведь без них невозможен процесс клеточного деления, митоз. Замечательным свойством микротрубочек, во многом определяющим их биологические функции, является полярность, то есть различия в скоростях связывания и отсоединения димеров альфа-бета тубулина на их так называемых плюс- и минус-концах. В живых клетках минус-концы микротрубочек, как правило, закорены на центрах организации, основным из которых является centrosoma, расположенная в центре клетки, в то время как свободные плюс-концы направлены к периферии и демонстрируют явление динамической нестабильности. Динамическая нестабильность была открыта Митчисоном и Киршнером в 1984 году, и с тех пор, благодаря своей фундаментальной значимости для понимания различных аспектов работы микротрубочек в живых системах, непрерывно находится в фокусе внимания многих исследовательских групп по всему миру. К настоящему времени описаны многие детали этого процесса и найдено большое количество белков, регулирующих динамическую нестабильность, также как и химических ингибиторов, влияющих на неё. Тем не менее, во многом молекулярные механизмы, лежащие в основе динамической нестабильности, остаются неизученными, как например, механизм спасений, и то, какую роль в нем играют дефекты решетки микротрубочек. Таким образом, изучение этих

механизмов и их регуляции является актуальной фундаментальной научной задачей, важность решения которой трудно переоценить.

Ключевым моментом при изучении динамики микротрубочек *in vitro* является создание контролируемых условий, при которых можно задокументировать этот процесс. Классическая схема, применявшаяся исследователями ранее, подразумевала прикрепление коротких затравок микротрубочек антителами к покровному стеклу, блокировку поверхности стекла для предотвращения неспецифического связывания молекул из раствора, и добавление в систему раствора тубулина с ГТФ, после чего на затравке начинался рост микротрубочки. Использование проточных камер, позволяющих быстро менять раствор тубулина над покровным стеклом, позволял исследовать влияние различных ингибиторов и белков на динамику микротрубочек, визуализируемую различными видами световой микроскопии.

Однако эта экспериментальная методика неизбежно подразумевает близость поверхности покровного стекла к динамической решетке микротрубочки. Вследствие этого нельзя полностью исключать возможность взаимодействия с ней молекул из раствора. Автором в процессе работы над диссертацией была разработана принципиально новая экспериментальная методика для исследования динамики микротрубочек на удалении от поверхности покровного стекла (на т.н. «микропьедесталах»), которая обеспечила формирование микротрубочек с более регулярной решеткой. Благодаря этому удалось получить новые и приоритетные научные результаты, основными из которых являются следующие: (1) Было показано, что дефекты решетки микротрубочек и динамические процессы в них играют основную роль в механизме спасений; путём экспериментальных измерений частот появления дефектов решетки микротрубочек и спасений было продемонстрировано, что вдали от поверхности покровного стекла микротрубочки имеют более регулярную решетку и реже испытывают спасения (2) Было показано, что винбластин и паклитаксель оказывают неаддитивные эффекты на динамику микротрубочек. Было также показано, что

паклитаксель вызывает спасения микротрубочек зависимым от их дефектов образом (3) Впервые была показана способность кумарина-30 связываться с колхициновым сайтом белка тубулина и подавлять динамику микротрубочек.

Диссертационная работа построена по традиционному принципу. Сначала расположен раздел «Общая характеристика работы», в котором изложены актуальность избранной темы, степень ее разработанности, цели, задачи, объект и предмет исследования, описаны научная новизна и значимость работы, её методология, положения, выносимые на защиту и сведения об апробации работы, а также о публикациях по теме диссертации и о личном вкладе автора. Раздел «Обзор литературы» разбит на подразделы, в которых последовательно приводятся данные о строении и свойствах микротрубочек и регуляции их динамики, и затем о методиках их исследования и поиска новых лигандов тубулина. В следующем за ним разделе «Материалы и методы» последовательно и подробно описаны использованные в ходе работы над диссертацией методы исследования, такие как выделение и очистка необходимых белков и создание стабилизированных микротрубочек-затравок, различных методов микроскопии, отбора веществ-кандидатов из базы данных NCI с помощью алгоритма COMPARE и способы изучения флуоресцентных свойств кумарина-30 и его взаимодействия с тубулином. При этом особый интерес представляет описание разработанного Анисимовым М.Н. в ходе работы над диссертацией протокола создания микропедесталов с использованием фотолитографии, а также специального алгоритма коррекции засветки на краях этих микропедесталов для улучшения качества получаемых изображений. Раздел материалов и методов тщательно написан; любой исследователь, пожелавший воспроизвести описанные эксперименты, при наличии необходимого оборудования может сделать это после ознакомления с текстом диссертации. Это красноречиво иллюстрирует долю личного участия автора в постановке описанных экспериментов.

В главе «Результаты и их обсуждение» последовательно и подробно изложены полученные автором данные. Так же как и весь текст диссертации в

целом, глава «Результаты и их обсуждение», изложена понятным языком и снабжена большим количеством качественного иллюстративного материала. В общей сложности диссертационная работа изложена на 130 страницах и содержит 37 рисунков. После разделов «Заключение» и «Результаты и выводы» приводятся публикации автора по теме диссертации, благодарности и список литературы, насчитывающий 114 наименований.

Текст диссертации хорошо написан и легко читается, практически не содержит опечаток, за исключением слова «уделёно» на стр.52. Не очень удачным выглядит название пятой главы, частично дублирующее название третьей («Результаты и их обсуждение», с.67., и «Результаты и выводы», с.113), однако такой вариант подразделения текста вполне приемлем и отвечает логике изложения материала. Пожалуй, единственное формальное замечание можно сделать по поводу вступительной части работы, где биологическая роль микротрубочек и их динамики раскрыта не полностью. В частности, в разделе «Общая характеристика работы» на стр.6 написано, что «...микротрубочки выступают в роли каркасных элементов внутри клетки и ключевого звена её сложной машинерии, обеспечивающей поиск, захват и разнесение хромосом по дочерним клеткам во время деления». Далее, в разделе «Обзор литературы» на стр. 14-15 указано, что «Внутри клетки микротрубочки выполняют множество различных функций благодаря своим уникальным свойствам. С одной стороны ... микротрубочки обладают значительной жесткостью и выполняют функцию каркасных структур внутри клетки. С другой стороны, микротрубочки очень динамичны, они могут спонтанно переключаться между фазами полимеризации и деполимеризации во время так называемых катастроф и спасений ... частота спасений снижается примерно в четыре-семь раз, а частота катастроф увеличивается примерно в два-три раза, когда соматические клетки млекопитающих вступают в митоз ... Считается, что это изменение в динамике микротрубочек имеет решающее значение для поиска и захвата хромосом». Таким образом, из всего этого читатель может сделать вывод, что динамика микротрубочек необходима лишь

во время митоза для захвата плюс-концами микротрубочек кинетохоров митотических хромосом, а в интерфазных клетках эти элементы цитоскелета выполняют лишь каркасную роль. Однако в действительности митоз длится весьма недолго относительно общей продолжительности клеточного цикла, и большую часть времени клетка проводит в интерфазе, в ходе которой динамика микротрубочек также необходима. Динамика микротрубочек обеспечивает механизм «search-and-capture», благодаря которому возможно существование внутриклеточного транспорта. Крупные по размерам эукариотические клетки нуждаются в быстром и эффективном способе доставки органелл и различных везикул в отдалённые клеточные компартменты. Этот транспорт осуществляется вдоль микротрубочек молекулярными моторами – цитоплазматическим динеином и кинезинами – с затратой АТФ. Он обеспечивает работу нейронов – клеток, которые делятся исключительно редко; но именно поэтому белок тубулин традиционно выделяют из мозга, как это делал и сам автор (см. стр.43, раздел 2.1.1). В целом, динамика микротрубочек обеспечивает «исследование» периферийных участков цитоплазмы интерфазных клеток с захватом и последующим перемещением грузов посредством динеина, и лишь изредка – поиск и захват кинетохоров митотических хромосом во время очередного деления.

Следует отметить, что сделанное замечание несколько не уменьшает значимость и качество проделанной работы, а также научную ценность полученных в ходе неё результатов. Резюмируя всё вышесказанное, можно заключить, что Анисимовым Михаилом Николаевичем получены результаты высокой степени достоверности и новизны, которые являются приоритетными и оригинальными. Результаты данного исследования существенно расширяют наши представления о механизмах, обеспечивающих динамику микротрубочек и об их регуляции. Положения, выносимые диссертантом на защиту, а также сформулированные им выводы полностью обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Полученные Анисимовым М.Н. 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 1.5.2 – Биофизика. Материалы диссертации полностью отражены в опубликованных по теме диссертации пяти статьях в рецензируемых журналах (из них в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК и индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI — 3 статьи) и были представлены на пяти всероссийских и международных конференциях.

По количеству и качеству обработанного материала, значению полученных научных результатов, уровню обобщения данных собственных исследований и сопоставления их с данными других авторов, диссертация Анисимова Михаила Николаевича представляет собой законченную в рамках поставленной цели фундаментальную работу, выполненную на самом высоком методическом уровне. Практическая значимость работы обусловлена возможностью применения полученных знаний в рамках критических технологий Российской Федерации, в частности, п.4.»Технологии разработки лекарственных средств и платформ нового поколения (биотехнологических, высокотехнологичных и радиофармацевтических лекарственных препаратов)». Результаты диссертации рекомендуются к применению при чтении лекций в общих курсах клеточной биологии биологических факультетов университетов и медицинских ВУЗов.


Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2 – Биофизика (по физико-математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, и оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на

соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Анисимов Михаил Николаевич заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика (физико-математические науки).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
НИИ Физико-химической биологии
имени А. Н. Белозерского МГУ
Бураков Антон Владимирович


"29" ноября " 2024 г.

Контактные данные:

тел.: 7(926)5853207, e-mail: antburakov@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

Адрес места работы:

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40
МГУ им. М.В. Ломоносова,
НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского,
e-mail для связи: fxb@genebee.msu.su
факс: +7 (495) 939-0338
канцелярия: +7 (495) 939-53-59

Подпись Буракова Антона Владимировича удостоверяю:

Заведующая канцелярией Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова,

Сидорова Наталия Николаевна, _____

ПЕЧАТЬ



"29" ноября " 2024 г.