

Российская академия наук
УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РАН

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-29, факс: (812) 297-03-41

ИНН 7802030531, КПП 780201001
УФК по г. Санкт-Петербургу
(ОФК 03, ИНЦ РАН), л/с 03319148830,
ГРКЦ ГУ Банка России по Санкт-Петербургу
р/с 40105810400000010001, БИК 044030001

07.04.2014 № 12316-662-141

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора
Института цитологии РАН
Академик И.Н.Никольский



7 апреля 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации

Буракова Антона Владимировича

**«ЦИТОСКЕЛЕТ КАК СИСТЕМА ПУТЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО
ТРАНСПОРТА В КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ»,**

**представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности «03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология».**

Клеточный цитоскелет, свойства его компонентов и архитектура в целом играет огромную роль в регуляции множества клеточных функций, таких как деление, локомоция, поляризация, внутриклеточная сигнализация и транспорт. С начала 80х годов прошлого века начался бурный рост интереса ко всем аспектам функционирования цитоскелета, особенно усилившийся в последние годы благодаря получению данных об участии микротрубочек и актиновых микрофиламентов в развитии ряда социально значимых патологий – от канцерогенеза и метастазирования до нейродегенеративных и иммунных патологий. Тем не менее, в силу сложной пространственной организации и высокой динамичности, цитоскелет остается сложным объектом для исследования. Это касается не только деталей какого-либо связанного с ним процесса, но и создания системной картины. Очевидно, однако, что понимание механизмов регуляции цитоскелета в целом важно не только для углубления фундаментального знания, но и в практическом смысле - для поиска новых мишеней и подходов. в терапии разного рода заболеваний.

Цитоскелет играет ключевую роль в обеспечении внутриклеточного транспорта в интерфазных клетках, однако много принципиальных вопросов остается нерешенными. Особое значение в организации внутриклеточных транспортных потоков имеют микротрубочки в силу своей радиальной организации в большинстве типов клеток, хотя механизмы установления и поддержания радиальности в целом остаются вопросом дискуссий. Так же далеко от понимания участие актина в перемещении клеточных частиц. С этой точки зрения диссертация А.В.Буракова исключительно актуальна, поскольку предлагает системные решения важных вопросов.

Работа построена по традиционному принципу и открывается главой «Введение», в которой кратко описана история вопроса, обосновываются и формулируются цели исследования, ставятся задачи и положения, выносимые на защиту.

В отличие от многих работ на соискание степени доктора наук, обзор литературы в диссертации А.В.Буракова относительно невелик, но объясняется это умением автора, отвлекаясь от мелочей, сконцентрироваться на главном. Все аспекты проблемы, связанные со структурой тубулинового и актинового цитоскелета, данных о механизмах работы centrosомы, опосредованного моторами транспорта и представлениями о транспортной роли микротрубочек и микрофиламентов, представлены четко и ясно.

Работа выполнена на исключительно высоком методическом уровне. Использован широкий спектр биохимических, клеточно- и молекулярно-биологических методов. Наряду с традиционными хочется отметить и ряд оригинальных подходов, в частности использование локальной аппликации деполимеризующих МТ агентов, использование «клеточных теней», безъядерных цитопластов. Широко применяются различные самые современные микроскопические подходы, а уровень иллюстраций в виде прижизненной центрифужной видеосъемки впечатляет. Сочетание прижизненной конфокальной микроскопии с электронной и системами *in vitro*, а также использование компьютерного моделирования изучаемых процессов позволяет делать обобщения высокой степени новизны, необходимые для работы такого уровня. Необходимо подчеркнуть, что всем этим экспериментальным набором автор владеет лично.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех частей. Первая посвящена анализу факторов, определяющих положение centrosомы, как организатора архитектуры МТ. В результате многочисленных экспериментов автор пришел к выводу, что околоядерное положение centrosомы, обеспечивающей радиальность системы микротрубочек, определяется тремя факторами: (1) работой цитоплазматического минус-концевого моторного белка динеина, активность которого регулируется малой ГТФазой Cdc42; (2) актомиозиновой системой и (3) динамикой плюс-концов микротрубочек. Баланс этих сил в живой клетке позволяет автору говорить о

существовании сложного саморегулирующегося процесса позиционирования центросомы.

В задачу второй части входил анализ роли динеина и серин/треониновой протеинкиназы LOSK в процессах организации микротрубочек вокруг центросомы. Полученные результаты позволяют автору утверждать, что как динеин, так LOSK, не влияя на процесс нуклеации МТ на центросоме, участвуют в их заякоривании и удержании, препятствуя хаотизации системы МТ. Используя клетки, в которые вводились различные мутантные формы белков, связанных с системой МТ, диссертант продемонстрировал, что за структурную целостность центросомы отвечает активность динеина, тогда как активность протеинкиназы LOSK требуется для поддержания необходимого уровня центросомного динактина. Закономерен вывод о том, что динеин и LOSK входят в число необходимых для функционирования центросомы белковых компонентов.

Третья часть диссертации посвящена изучению молекулярных механизмов внутриклеточного транспорта по другой транспортной сети – системе актиновых микрофиламентов. В литературе актиновые сети редко рассматриваются как транспортные системы. В качестве модели были выбраны культивируемые пигментные клетки лягушки – меланофоры, для которых представления о роли микротрубочек и актина в скоординированном транспорте пигментных гранул можно считать довольно развитыми. Эта часть особенно интересна анализом движения частиц в различных экспериментальных условиях, позволившем показать, что ключевую роль в движении частиц актин играет не благодаря наличию активных моторов, а благодаря высокой динамичности филаментов: стабилизация МФ приводила и к остановке движения меланосом. Оценка скоростей тредмлинга и движения моторов позволил автору разрешить проблему, остававшуюся без ответа и объяснить, почему, при наличии двунаправленных моторов, движение по микрофиламентам возможно только в одном направлении. В результате впервые построена внутренне непротиворечивая схема внутриклеточного транспорта по актину. Подчеркну, что этому способствовала способность автора критически оценить традиционные представления о работе актиновых структур и отойти от представления о них как о «рельсах», по которым моторы переносят свои грузы. Это, несомненно свидетельствует о зрелости А.В.Буракова как ученого, не только в экспериментальном, но и в теоретическом плане, что подтверждает как обсуждение результатов, так и краткое, но емкое «Заключение». В пользу такого предположения свидетельствует не только публикация результатов в высокорейтинговых научных реферируемых журналах, но и показатели цитирования автора в международной системе ISI Web of Science.

Несомненно, работа заслуживает самой высокой оценки. В порядке дискуссии хотелось бы задать автору следующий вопрос: роль актина как транспортной системы была исследована на таком специфическом объекте, как меланофор, который эволюционно заточен под скоординированные кластеризацию и максимально равномерное распределение меланосом по клетке при дисперсии. На видео, представляющем процесс дисперсии частиц при разрушении микротрубочек, видно, что частицам практически не удается выйти в ламеллу меланофора из относительно ограниченной околядерной области. Получается, что за перемещение по большей части клетки ответственен именно актин – ситуация, насколько мне известно, нехарактерная для большинства клеток, даже распластанных (таких как HeLa и др). Не может ли это быть связано с особенностями экспериментальной системы, ведь процесс очень напоминает движение меланосом по узким дендритам меланоцитов, которое осуществляется с помощью меланофилина и миозинаV по примембранному слою актиновой сети? Опосредуемое актином перемещение пигментных гранул в данном случае Вы связываете с примембранным слоем или с актиновой сетью непосредственно в цитоплазме? Насколько движение по актину, с Вашей точки зрения, может быть характерно для других клеточных систем, обладающих более «толстым» слоем цитоплазмы?

В целом, А.В.Бураковым получены результаты высокой степени достоверности и новизны, они являются оригинальными и приоритетными. Эти результаты не только расширяют имевшиеся ранее представления об организации цитоскелета и о механизмах внутриклеточного транспорта, но позволяют формулировать новые направления для исследований регуляторных механизмов внутриклеточного трафика. Таким образом, на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое научное достижение в области клеточной биологии

Текст работы является оригинальным, все данные изложены достаточно полно и снабжены необходимым иллюстративным материалом. Диссертация изложена на 232 страницах машинописного текста и иллюстрирована 63 рисунками и 4 таблицами., в том числе 21 видео высокого качества.

Тема и содержание диссертации соответствуют специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. Материалы диссертации полностью отражены в опубликованных по теме диссертации 15 статьях и 33 тезисах докладов конференций.

В целом по количеству и качеству обработанного материала, смыслу и значению научных результатов, существенная часть которых получена впервые, уровню обобщения данных

собственных исследований и полученных в других лабораториях работа Антона Владимировича Буракова представляет собой законченный в рамках поставленной задачи монументальный труд, выполненный на самом высоком методическом уровне.

Практическая значимость работы обусловлена возможностью применения полученных фундаментальных знаний в рамках критических технологий Российской Федерации, в частности «Клеточные технологии» и «Биомедицинские и ветеринарные технологии». Использование ее результатов может быть исключительно полезным для определения новых терапевтических мишеней при лечении ряда социально значимых заболеваний. Результаты диссертации рекомендуется использовать при чтении лекций в общих курсах клеточной биологии и спецкурсах магистерских программ биологических факультетов университетов и медицинских ВУЗов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Буракова Антона Владимировича является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научные достижения в области регуляции цитоскелета и внутриклеточного транспорта, что полностью соответствует п.9 Положения о порядке присуждения учёных степеней, утверждённого постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013г. № 842, а диссертант заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании семинара Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Института цитологии РАН

протокол N 2 от 7 апреля 2014 г.).

Зав. лабораторией динамики внутриклеточных мембран
Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта
ФГБУН «Институт цитологии РАН»

Д.б.н., профессор

Е.С. Корнилова

7 апреля 2014 г.

