

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Фокина Артема Игоревича

**«ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА
И РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ ПРОТЕИНКИНАЗОЙ LOSK/SLK»,
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.03.04 – гистология, цитология, клеточная биология**

Исследование внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих процессы организации и движения клеток представляют важную и сложную задачу, поскольку даже небольшие изменения в этих путях могут привести к развитию серьезных патологий. Одним из важных сигнальных белков в клетке является серин-треониновая протеинкиназа LOSK, для которой ранее показано участие в регуляции дифференцировки клеток, прохождении ими клеточного цикла и апоптоза, а также в организации цитоскелета, в поляризации и миграции клеток. При этом, хотя число известных мишеней LOSK относительно невелико, механизмы ее действия до конца не известны, в частности не были ясны молекулярные механизмы действия LOSK на организацию микротрубочек, регуляцию внутриклеточного транспорта и направленной миграции клеток. Исследованию этих механизмов и посвящена данная работа. В работе были поставлены конкретные задачи, по последовательному исследованию всех мишеней, которые теоретически могут принимать участие в этих процессах, а именно – исследование взаимодействий LOSK с белком p150^{Glued}, который является субъединицей динеин-динактинового комплекса, исследование влияния LOSK на внутриклеточный транспорт, изучение влияния LOSK на организацию микротрубочек, а именно на построение регулярной сети и на сборку микротрубочек на Аппарате Гольджи, выяснение регуляций центриольной локализации белков PCM-1 и p150^{Glued}, выяснение молекулярных путей с помощью которых LOSK регулирует поляризацию клеток и их миграцию. Это очень непростые задачи, потому что внутриклеточная сигнальная сеть устроена сложно, и чтобы выделить ее отдельные элементы, необходим тщательный анализ активности вовлеченных белков. В данной работе использовано 31 генетическая конструкция, 13 из которых было получено непосредственно в ходе выполнения работы (а это значит - получены точечные мутации в определенных

районах исследуемых белков с помощью сайт-направленного мутагенеза, конструкции проверены на правильность полученных мутаций автоматическим секвенированием ДНК, а также электрофорезом и иммуноблотингом кодируемых белков). Эти конструкции несли мутации, меняющие активность исследуемых белков или регулирующие возможность взаимодействия с киназой LOSK и таким образом позволили очень аккуратно включать и выключать разные составляющие исследуемых регуляторных путей. .

Работа написана по стандартному образцу, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, библиографического списка и приложения. Обзор литературы достаточно полный, дает представление о состоянии проблемы на настоящий момент, дополнен схемами и рисунками, помогающими разобраться в представленном материале. Методические подходы описаны достаточно подробно. Обращает внимание разнообразие молекулярных подходов, наряду с классическим клеточно-биологическими методами и микроскопией, автор использует большое количество молекулярно-биологических методов, демонстрируя легкость в использовании самых разных подходов.

В процессе выполнения работы установлено, что фосфорилирование одной из основных мишеней LOSK ассоциированных с цитоскелетом – компонента динеина белка $p150^{\text{Glued}}$ - осуществляется по треонинам 145-147 и приводит к centrosomal локализации динактина и белка PCM-1, и, соответственно, обеспечивает радиальную организацию системы микротрубочек. Именно эта активность LOSK влияет на увеличение эффективности транспорта в клетке и способствует сборке аппарата Гольджи. В то же время активность LOSK не влияет на функционирование динеин-динактинового комплекса и на сборку микротрубочек на аппарате Гольджи. Регуляция киназой LOSK направленной миграции клеток оказалась опосредованной фосфорилированием двух ее субстратов – $p150^{\text{Glued}}$ и RhoA. Показано, что взаимодействие с $p150^{\text{Glued}}$ отвечает за организацию микротрубочек и поляризацию клеток, а с Rho A – за обеспечение скорости движения клеток и за возможность формирования клетками полноценной ламеллиподии. В качестве еще одного возможного объяснения почему доминантно-негативная LOSK подавляет поляризацию клеток на краю раны могу предложить следующее: снижение активности LOSK приводит к активации RhoA через белок p160 (показано авторами). Это в свою очередь может

приводить к подавлению другой малой ГТФазы Rac1, отвечающей за образование ламеллиподии. Поэтому в клетках, несущих доминантно-негативную LOSK нарушено формирование ламеллиподии и соответственно выплзание клеток из поврежденного монослоя.

Выводов в диссертации 9, они полностью, даже в некоторых случаях несколько чрезмерно подробно, отражают полученные результаты.

При чтении работы возникают отдельные замечания. Замечаниями общего характера являются

- довольно тяжелый текст, что можно объяснить сложной постановкой экспериментов, когда с помощью комбинации разных генетических конструкций авторы активировали или ингибировали отдельные участки регуляторных цепей.
- Не очень удачное форматирование текста диссертации, когда подписи к некоторым рисункам оказывались на другой странице, что затрудняло чтение.
- Часть иммунофлуоресцентных фотографий напечатано слишком темно и поэтому не всегда хорошо видно отдельные клеточные элементы.

Основным методическим замечанием является то, что я считаю измерение направленности движения клеток, мигрирующих в составе монослоя не совсем корректным, потому что движение этих клеток ограничено соседями и направленность задается в большей степени именно этим обстоятельством. Кроме того при исследовании действия различных форм LOSK, меняющих свою активность в результате точечных мутаций, активность эндогенной LOSK задавлена не была, что могло влиять на конечный результат.

Сделанные замечания в основном носят дискуссионный или редакционный характер и не умаляют достоинств диссертации.

Достоверность полученных данных подтверждается большим объемом воспроизводимых результатов, а также статистической обработкой всех ключевых данных.

Таким образом, в результате проделанной работы авторам удалось выявить молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции киназой LOSK организации цитоскелета и миграционных характеристик клеток, что является важной задачей клеточной биологии, имеющей теоретическое значение.

Расшифровка этих сигнальных путей может помочь в изучении основ некоторых патологических процессов при которых показано изменение активности LOSK или ее эффекторов, таких как некоторые нейродегенеративные заболевания (латеральный амиотрофический склероз, синдром Перри и другие).

Еще одним практическим итогом диссертации являются сконструированные автором мутантные белки, которые могут быть использованы в последующих исследованиях в данной области клеточной биологии. Данные полученные авторами, в частности итоговая схема, представленная на Рис. 35 могут быть использованы в учебном процессе при чтении лекций студентам биологических факультетов.

По результатам исследования опубликовано 3 статьи, 2 из которых в рецензируемых журналах в рецензируемых журналах, результаты доложены на 13 конференциях, в том числе международных конференциях очень высокого уровня (38 конгресс FEBS, съезды Американского общества клеточных биологов ASCB-2013, ASCB-2014)

Диссертация оформлена в соответствии с действующими правилами ВАК, компьютерная печать четкая, текст хорошо выверен. Автореферат соответствует содержанию диссертации и отражает содержание публикаций автора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа А.И. Фокина «ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА И РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ ПРОТЕИНАЗИНОЙ LOSK/SLK», является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для биологической отрасли науки в области клеточной биологии, цитологии и гистологии и полностью соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации, представленные на соискание ученой степени кандидата наук п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а её автор

заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

25 ноября 2015

Ведущий научный сотрудник ФГБУ «РОНЦ им.Н.Н. Блохина» Минздрава России,
доктор биологических наук

А.Ю. Александрова

Подпись А.Ю. Александровой заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
кандидат медицинских наук



И.Ю. Кубасова

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по кандидатской диссертации Фокина Артёма Игоревича «**Изучение молекулярных механизмов организации цитоскелета и регуляции клеточной подвижности протеинкиназой LOSK/SLK**» по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Фамилия, имя, отчество	Александрова Антонина Юрьевна
Учёная степень	Доктор биологических наук
Специальность	03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
Место работы, занимаемая должность	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза.
Почтовый адрес учреждения	115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе д.23
Адрес электронной почты	tonya_alex@yahoo.com
Рабочий телефон	8-499-323-53-11
Список публикаций за последние 5 лет по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях	1. A. Alexandrova, A. Chikina. / The plasticity of tumor cell migration mechanism is adaptive factor increasing metastasis efficiency. //European Journal of Cancer Supplements, - 2015 - V. 13, (1), P. 1-2, doi.org/10.1016/j.ejcsup.2015.08.003 2. Chikina A.S., Alexandrova A.Y. / The cellular mechanisms and regulation of metastasis formation. // Molecular Biology. – 2014 – 48(2) – p. 165-180. 3. Alexandrova AY / Plasticity of tumor cell migration: acquisition of new properties or return to the past? //Biochemistry (Mosc) - 2014 - 79(9) – p. 947-63. 4. Efremov YM, Lomakina ME, Bagrov DV, Makhnovskiy PI, Alexandrova AY, Kirpichnikov MP, Shaitan KV. / Mechanical properties of fibroblasts depend on level of cancer

	transformation. //Biochim Biophys Acta - 2014 - 1843(5) – p. 1013-9. 5. Dang I, Gorelik R, Sousa-Blin C, Derivery E, Guérin C, Linkner J, Nemethova M, Dumortier JG, Giger FA, Chipysheva TA, Ermilova VD, Vacher S, Campanacci V, Herrada I, Planson AG, Fetics S, Henriot V, David V, Oguievetskaia K, Lakisic G, Pierre F, Steffen A, Boyreau A, Peyriéras N, Rottner K, Zinn-Justin S, Cherfils J, Bièche I, Alexandrova AY, David NB, Small JV, Faix J, Blanchoin L, Gautreau A. / Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration. // Nature - 2013 - 503(7475) – p. 281-4 6. Gautier JJ, Lomakina ME, Bouslama-Oueghlani L, Derivery E, Beilinson H, Faigle W, Loew D, Louvard D, Echard A, Alexandrova AY, Baum B, Gautreau A. // Clathrin is required for Scar/Wave-mediated lamellipodium formation. // J Cell Sci. - 2011 - 124(Pt 20) – p. 3414-27. 7. Shutova M.S., Alexandrova A.Y. / Normal and transformed fibroblast spreading: role of microfilament polymerization and actin-myosin contractility. // Cell and Tissue Biology – 2010 – 4 (1) - p. 25-35.
--	--

Ведущий научный сотрудник
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Александрова А.Ю.

Подпись Александровой А.Ю. заверяю

Ученый секретарь
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России



Кубасова И.Ю.

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу А.И. Фокина «Изучение молекулярных механизмов организации цитоскелета и регуляции клеточной подвижности протеинкиназой LOSK/SLK», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

Механизмы клеточной подвижности являются актуальной проблемой клеточной биологии. Их понимание имеет важное значение для медицины, поскольку многие патологические процессы в организме человека напрямую связаны с изменениями двигательных реакций клеток и внутриклеточного транспорта. В качестве примеров можно привести процессы метастазирования и неуправляемого деления раковых клеток, которые возможно затормозить антимикротрубочковыми агентами; кеппирование рецепторов на мембране иммунных клеток при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях и трансмиграцию этих клеток из кровеносных сосудов в ткани – процессы, зависимые от динамики актина и актомиозинового сократительного аппарата клеток; развитие острой сосудистой гиперпроницаемости, опосредуемой как актомиозиновым цитоскелетом, так и микротрубочками, врожденные дисплазии органов и тканей, часто связанные с нарушением перемещений клеток в эмбриогенезе, и многие другие ситуации.

Одним из недостаточно изученных молекулярных регуляторов клеточной подвижности является серин-треониновая протеинкиназа LOSK (LONg Ste20-like Kinase). Она была открыта в 1997 году независимо двумя группами исследователей. Одной из этих групп руководила и руководит сегодня проф. Е.С. Надеждина. Поэтому совершенно логично, что в ее лаборатории продолжается систематическое исследование LOSK. За прошедшие годы было установлено, что LOSK участвует в регуляции клеточного цикла, апоптоза и дифференцировки клеток, регулирует состояние актинового цитоскелета и микротрубочек, способствуя ассоциации последних с центросомой. Идентифицирован ряд субстратов LOSK, к которым относятся, в частности, компонент динактинового комплекса - белок p150^{Glued}, малая ГТФаза RhoA и белок фокальных контактов паксиллин. Таким образом, по клеточно-физиологическим проявлениям своей активности и по профилю субстратов LOSK, несомненно, является важным регулятором клеточной подвижности посредством обратимого фосфорилирования белков-мишеней и как компонент внутриклеточных интерактосом, вовлеченных в регуляцию цитоскелета. В то же время остаётся невыясненным, какие сигнальные пути от LOSK участвуют в регуляции различных аспектов подвижности клеток, в частности, в образовании упорядоченной системы микротрубочек и в направленной миграции клеток.

Автор рецензируемой работы, Артем Игоревич Фокин, продолжая изучение LOSK в лаборатории проф. Е.С. Надеждиной, сфокусировался на этих малоизученных вопросах и поставил перед собой следующие задачи:

- 1) Изучить особенности фосфорилирования белка p150^{Glued} протеинкиназой LOSK в белке дикого типа и в его мутантах R148W и R149Q, обнаруженных у больных боковым амиотрофическим склерозом.
- 2) Изучить влияние киназы LOSK на сборку и клеточную локализацию динеин-динактинового комплекса и внутриклеточный транспорт в кратковременных и долговременных событиях.
- 3) Изучить влияние активности LOSK на локализацию centrosомного белка PCM-1 и образование первичных ресничек в клетках.
- 4) Изучить участие LOSK в организации микротрубочек на аппарате Гольджи.
- 5) Определить, какие из сигнальных путей, регулируемых киназой LOSK путем фосфорилирования ее известных субстратов p150^{Glued} и RhoA участвуют в направленном движении клеток. В том числе, выяснить, опосредована ли регуляция киназой LOSK клеточной подвижности её влиянием на активность основного эффектора RhoA - киназы p160ROCK.
- 6) Оценить вклад радиальной системы микротрубочек, регулируемой LOSK, на подвижность клеток.

Для выполнения поставленных задач диссертант применил широкий и современный набор методов молекулярной и клеточной биологии, белковой биохимии и иммунохимии. В частности, в работе им было создано 13 генетических конструкций для экспрессии интересующих белков в бактериальной и эукариотической системах и использовано 18 генетических конструкций, созданных другими авторами. Автор освоил и применил оптические методы анализа клеточной подвижности и внутриклеточного транспорта органелл и их количественного обсчета, методы получения цитопластов, липофекции клеток, иммунофлуоресцентного окрашивания клеток, иммунопреципитации, электрофореза и иммуноблоттинга белков, выделения рекомбинантных белков и фосфорилирования белков *in vitro*.

С помощью использованных методических приемов диссертант получил следующие основные результаты, которые отражены в выводах диссертации.

1. Мутации R148W и R149Q в белке p150^{Glued} не препятствуют его фосфорилированию киназой LOSK по треонинам 145-147, и, возможно, даже усиливают это фосфорилирование.
2. Фосфорилирование белка p150^{Glued} киназой LOSK по треонинам 145-147 способствует центросомной локализации динактина, но не влияет на сборку динактинового комплекса.
3. Ингибирование киназы LOSK приводит к нарушению эффективности внутриклеточного транспорта в долговременных событиях, но не оказывает влияния на мгновенную скорость перемещения везикул в клетке.
4. Активность LOSK необходима для центросомной локализации белка PCM-1, вероятно, за счёт образования упорядоченной системы микротрубочек с центром в центросоме. При этом ингибирование LOSK не препятствует сборке первичных ресничек в клетках.
5. Ингибирование киназы LOSK не отражается на организации микротрубочек на мембранах аппарата Гольджи.
6. Ингибирование киназы LOSK приводит к снижению скорости и направленности миграции фибробластоподобных клеток, а также к нарушениям их поляризации и формирования ламеллоподии на краю раны монослоя. Аналогичный эффект вызывает синтез в клетках нефосфорилируемого по Ser188 мутанта малой ГТФазы RhoA.
7. На фоне ингибирования киназы LOSK синтез в клетках имитирующей фосфорилирование по Ser188 малой ГТФазы RhoA способен восстанавливать скорость передвижения клеток и отчасти их поляризацию, а синтез имитирующего фосфорилирование белка p150^{Glued} восстанавливает поляризацию клеток, но не их подвижность.
8. Ингибирование основного эффектора RhoA – киназы p160ROCK - приводит к снятию негативного эффекта на движение клеток нефосфорилируемой RhoA и доминантно-негативной киназы LOSK.
9. Активность киназы LOSK обеспечивает подвижность клеток независимо от образования упорядоченной системы микротрубочек.

По существу полученных результатов можно высказать следующие замечания и комментарии.

1. Фосфорилирование p150^{Glued} киназой LOSK по треонинам 145-147 in vitro.

Из приведенных на рис. 8 данных не совсем очевидно, что T147 является наиболее «фосфорилируемым» остатком для LOSK. Сравнивая нагрузку по белку и включение

фосфата, можно согласиться, что это так в сравнении с T146, однако, T145 тоже может оказаться предпочтительным для LOSK остатком. Для выяснения этой возможности следовало количественно оценить удельное включение фосфата в различные мутанты p150^{Glued}, тем более что в работе использовали фосфоимиджер. Оценка общего белка по окраске Понсо С не лучший вариант нормировки, это низкофинная легкосмываемая краска, целесообразно пользоваться краской Кумасси R-250. Кстати, после мутирования всех трех треонинов T145-147 в аланины включение фосфата в p150^{Glued} под действием LOSK полностью не прекращалось хотя и значительно ослаблялось. Вероятно, в p150^{Glued} есть и другие минорные серины / треонины, фосфорилируемые этой протеинкиназой. На рис. 8 в полосе SLK в дорожке, где она фосфорилирует тройной мутант p150^{Glued}, виден более высокий уровень автофосфорилирования протеинкиназы, чем в других дорожках. Почему он разный, и как это может отразиться на результатах фосфорилирования p150^{Glued}? Также обращает на себя внимание почти стехиометрическое соотношение LOSK (10 мкг) и p150^{Glued} (20-30 мкг) в реакциях фосфорилирования. Обычно протеинкиназы добавляют в значительно меньших количествах (1:100 - 1:500, м:м), чтобы уменьшить вероятность неспецифического фосфорилирования.

Весьма интересны данные автора относительно возможно более высокого уровня фосфорилирования треонинов 145-147 в p150^{Glued}, имеющем мутации R148W и R149Q, обнаруженные у больных боковым амиотрофическим склерозом. Хотелось бы видеть количественное представление этих результатов, которые в комплексе с преимущественно центросомной локализацией мутантного белка в клетках позволили бы более уверенно разбираться в вопросах молекулярных механизмов развития этого очень серьезного заболевания.

2. LOSK и организация радиальной системы микротрубочек.

В серии логичных экспериментов, применяя различные маркерные генетические конструкции, трансфицируемые в клетки, автор достаточно убедительно показывает, что фосфорилирование p150^{Glued} LOSK стимулирует накопление этого белка в области центросомы, а при ингибировании LOSK нарушается сразу несколько процессов – локализация на центросоме p150^{Glued} и белка PCM-1, зависимый от микротрубочек внутриклеточный транспорт везикул комплекса Гольджи и сама радиальная организация микротрубочек. При этом не нарушается образование динактинового комплекса, в состав которого входит p150^{Glued}, и активность динеинового транспорта. Эти данные согласуются с представлениями о том, что LOSK обеспечивает формирование радиальной системы микротрубочек, отходящей от центросомы. В отсутствие такой системы в результате

ингибирования LOSK закономерно нарушается транспорт к centrosome PCM-1 и других компонентов перичентриольного матрикса, а также перемещение к centrosome динеиновых моторных комплексов, сборка везикул комплекса Гольджи после воздействия брефелдина А. В то же время интересно отметить, что роль LOSK в формировании радиальной системы микротрубочек на неcentросомных ЦОМТ, например, на мембранах аппарата Гольджи, как показал диссертант, незначительна.

3. LOSK и регуляция клеточной подвижности.

В этом разделе работы диссертант выяснял роль протеинкиназы LOSK в контроле направленности движения клеток, как функции поляризации системы микротрубочек посредством p150^{Glued}, и в контроле скорости движения, как интегральной функции модуляции активности RhoA, одного из субстратов LOSK и активатора протеинкиназы ROCK. Было сделано заключение, что эти две функции реализуются достаточно независимо и что для направленного движения важно фосфорилирование p150^{Glued}, а скорость движения в использованных модельных клетках Vero в основном определяет ROCK. Вместе с тем, RhoA через регуляцию своих эффекторов форминов (mDia) также может воздействовать и на состояние микротрубочек. Однако, средство форминов к актиновым филаментам выше. Более того, ROCK опосредованно регулирует ацетилирование и стабильность микротрубочек. Такую сложную сеть молекулярных событий, запускаемых в каскаде LOSK-RhoA-эффекторы, очень непросто однозначно интерпретировать, что, собственно, и происходит в последних главах работы. Дополнительным и, увы, неизбежным обстоятельством, усложняющим интерпретацию результатов, является сам методический подход – сверхэкспрессия генетических конструкций LOSK, p150^{Glued}, RhoA и др. в клетках. В такой ситуации вполне возможна диссоциация между способностью клеток к направленной миграции и состоянием их микротрубочек, но остается вопрос – насколько это приложимо к интактной клетке в культуре или *in vivo*.

Имеются замечания по оформлению диссертации. Встречаются опечатки, например, на сс. 105, 110, рис. 25 (упоминаются 24а, 24б в подписи к этому рисунку), рис. 26, 28, 29 («скорость движение» по ординате). Удивление вызывает полное отсутствие на всех микрофотографиях клеток размера масштабного отрезка в микронах. Часть микрофотографий очень темные, плохо видны микротрубочки. На рисунках с количественным представлением данных не дано количество экспериментов (n=?), не дано оно и в тексте. На рис. 16 не обозначена ордината. На рис. 34б есть пунктирная

линия г.d. Что она обозначает? На рис. 34г не даны разбросы значений. На рис. 21, 23 и некоторых других даны разбросы, но не отмечены звездочкой достоверные различия. На рис. 27 указаны достоверности, но не понятно, что с чем сравнивали. В тексте на с. 53 неверная расшифровка аббревиатуры SE, standart error of meaning, должно быть standard error of mean. Изредка используется англо-лабораторный жаргон – «конструкт» вместо «конструкция».

Диссертация написана по общепринятому плану и состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов, Заключение, Выводы, Список сокращений, Список цитируемой литературы, Приложение – дополнительный иллюстративный материал. Общий объем диссертации 140 страниц. Обзор литературы занимает 40 стр. Он написан хорошим, четким языком, иллюстрирован 6 рисунками. Автор показывает хорошее владение литературным материалом и навыки его анализа. Обзор успешно выполняет функцию ознакомления читателя с проблемой, решаемой в диссертации, и логично подводит его к рассмотрению результатов собственных исследований автора. Раздел Материалы и методы написан подробно и позволяет понять детали постановки экспериментов. Раздел Результаты представляет собой последовательность коротких подглавок, в каждой из которых ставится и решается один вопрос и дается 1-2 иллюстрации с данными экспериментов. Такое представление результатов делает весь раздел динамичным и помогает читателю фокусировать внимание. Обсуждение результатов работы также проведено динамично и лаконично и заканчивается схемой возможного участия LOSK в регуляции клеточной подвижности. Всего лишь один абзац в обсуждении посвящен третьему субстрату LOSK – белку фокальных контактов паксиллину, и автор считает, что роль его фосфорилирования этой протеинкиназой частная в контексте данной работы. Это не совсем убедительно, принимая во внимание тот факт, что динамика фокальных контактов напрямую влияет на параметры движения клетки по субстрату. Диссертационная работа содержит 9 выводов.

В целом, диссертационная работа А.И. Фокина представляет собой завершенный научно-квалификационный труд. В нем получены оригинальные и достоверные результаты, они доложены на международных и российских конференциях и опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах, а также в виде главы в сборнике. Выводы корректно отражают полученные диссертантом данные. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации. Высказанные

замечания не носят принципиального характера и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Таким образом, диссертационная работа А.И. Фокина полностью соответствует критериям, установленным «Положением о порядке присуждения учёных степеней» от 24 сентября 2013г. № 842 (пункт 9), а ее автор Артем Игоревич Фокин заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Руководитель лаборатории клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
Российского Кардиологического
Научно-производственного Комплекса
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор биологических наук, профессор



В.П. Ширинский

ФГБУ РКНПК МЗ РФ

ул. 3-я Черепковская д. 15а, Москва 121552, Россия

shirinsky@cardio.ru

тел.: 8495-414-7246

29 ноября 2015 г.



Подпись д.б.н., проф. В.П. Ширинского заверяю:

Ученый секретарь НИИЭК РКНПК МЗ РФ



С.А. Левашова

В диссертационный совет Д 501.001.52
при Московском государственном
университете имени М.В. Ломоносова

Сведения об официальном оппоненте по кандидатской/докторской диссертации
Фокина Артёма Игоревича «**Изучение молекулярных механизмов организации
цитоскелета и регуляции клеточной подвижности протеинкиназой
LOSK/SLK**»

Фамилия, имя, отчество (полностью)	Ширинский Владимир Павлович
Ученая степень, отрасль науки, шифр и наименование научной специальности	Доктор биологических наук, 14.00.06 - кардиология, 03.00.04 - биохимия
Ученое звание	профессор
Место работы, занимаемая должность	Институт экспериментальной кардиологии Российского Кардиологического Научно-производственного Комплекса Министерства здравоохранения Российской Федерации, ИЭК ФГБУ РКГПК МЗ РФ, директор института
Адрес почтовый учреждения	121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а
Адрес электронной почты учреждения	info@cardioweb.ru
Телефон учреждения	(499) 140-93-36, 149-17-08

Список публикаций **Ширинского Владимира Павловича** по теме диссертации
Фокина Артёма Игоревича в рецензируемых научных изданиях за последние 5
лет.

Вилиткевич Е.Л., Хапчаев А.Ю., Кудряшов Д.С., Никашин А.В., Шавоки Дж.П.,
Лукас Т.Дж., Ваттерсон Д.М., Ширинский В.П.
ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ РЕГУЛИРУЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ N-КОНЦЕВОГО
ДОМЕНА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ КИНАЗЫ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА С
АКТИНОВЫМ ЦИТОСКЕЛЕТОМ
Биохимия. 2015. Т. 80, № 10. С. 1561–1571.

Хапчаев А.Ю., Самсонов М.В., Казакова О.А., Вилиткевич Е.Л., Сидорова М.В.,
Азьмуко А.А., Молокоедов А.С., Беспалова Ж.Д., Ширинский В.П.
ПОДАВЛЕНИЕ ГИПЕРПРОНИЦАЕМОСТИ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ С
ПОМОЩЬЮ ПРОНИКАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ КИНАЗЫ ЛЕГКИХ
ЦЕПЕЙ МИОЗИНА
Биофизика. 2012. Т. 57. № 5. С. 764-770.

Секридова А.В., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Молокоедов А.С., Бушуев В.Н.,
Марченко А.В., Щербакова О.В., Ширинский В.П., Беспалова Ж.Д.

ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ КИНАЗЫ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА,
УСТОЙЧИВЫЕ К ДЕЙСТВИЮ ПЕПТИДАЗ
Биоорганическая химия. 2010. Т. 36. № 4. С. 498-504.

Марченко А.В., Степанова Е.О., Секридова А.В., Сидорова М.В., Бушуев В.Н.,
Беспалова Ж.Д., Ширинский В.П.

НОВЫЕ ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ КИНАЗЫ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА
ПОДАВЛЯЮТ ГИПЕРПРОНИЦАЕМОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

Биофизика. 2010. Т. 55. № 6. С. 1008-1013.

Степанова О.В., Чадин А.В., Масютин А.Г., Куликова Т.Г., Гурин Я.В., Сергеева
И.А., Ширинский В.П.

RHO-АССОЦИИРОВАННАЯ КИНАЗА УЧАСТВУЕТ В ФОРМИРОВАНИИ
СОКРАТИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА КАРДИОМИОЦИТОВ

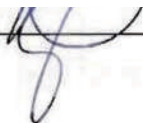
Биофизика. 2010. Т. 55. № 5. С. 880-885.

Shcherbakova O.V., Serebryanaya D.V., Shirinsky V.P., Vorotnikov A.V., Postnikov
A.B., Schroeter M.M., Zित्रich S., Pfitzer G., Noegel A.A.

KINASE-RELATED PROTEIN/TELOKIN INHIBITS Ca^{2+} -INDEPENDENT
CONTRACTION IN TRITON-SKINNED GUINEA PIG TAENIA COLI

Biochemical Journal. 2010. Т. 429. № 2. С. 291-302.

Подпись _____ /Ширинский Владимир Павлович/



Подпись д.б.н., проф. В.П. Ширинского заверяю:

Ученый секретарь НИИЭК РКНПК МЗ РФ



С.А. Левашова