

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Ивановой Анастасии Сергеевны «Роль генов *Agg* и *Ras-dva* в раннем развитии мозга и при регенерации придатков тела у низших позвоночных», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа Ивановой А.С. является законченным, глубоким, выполненным на современном уровне, исследованием. Оно посвящено изучению роли групп генов, а именно генов малых ГТФаз семейства *Ras-dva*, а также генов, кодирующих секретлируемые белки семейства *Agg* (*anterior gradient*), относящихся к суперсемейству дисульфид изомераз белков, в развитии и регенерации низших позвоночных. В ходе эволюции гены *Ras-dva* и *Agg* семейств пропадают у представителей высших позвоночных, что позволяет их использование для объяснения присутствия или исчезновения регенерационной способности у позвоночных и человека. Работа проведена на двух традиционных моделях регенерационной биологии, головастиках шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и взрослой рыбы *Danio rerio*.

Диссертационная работа Ивановой А. С. имеет достаточный объем (126 стр.) и содержит два больших раздела. Первый посвящен изучению роли открытых в лаборатории генов *Ras-dva* и *Agg* семейств в ходе раннего развития переднего мозга амфибий, второй – связи этих генов со способностью низших позвоночных (рыб и амфибий) к регенерации придатков тела. Известно, что регенерационные процессы используют механизмы (в том числе и регуляторные), лежащие в основе развития тканей. По этой причине разделы работы являются взаимосвязанными, дополняющими друг друга. Оба направления работы **актуальны**. Изучение раннего развития конечного мозга позвоночных необходимо для понимания врожденных патологий и их устранения, а познание молекулярных механизмов регенерации – для преодоления эволюционно возникших ограничений регенерационной способности у высших позвоночных и человека. Работа имеет большое значение как **новое, фундаментальное** исследование, способное помочь разработке практических приемов для стимуляции регенерации у высших позвоночных и человека.

Текст диссертации Ивановой А.С. сформирован по стандартному плану, имеет все необходимые главы. Во введении, что уместно и важно, указано на предшествующие работы лаборатории, где в свое время впервые были идентифицированы новые гены, отвечающие за раннее развитие переднего мозга позвоночных. Приведена история развития направления, логично подводящая к постановке **целей и задач**. Они состояли: 1) в изучении сигнального каскада, регулируемого генами *Agg* и *Ras-dva* в ходе раннего развития переднего мозга, и 2) в проверке гипотезы о том, что исчезнувшие в ходе эволюции у высших позвоночных гены *Agg1*, *Ras-dva1* и *Ras-dva2* действительно принимают участие в регуляции регенерации придатков тела у рыб и амфибий.

Разделы **обзора литературы** (36 стр.), соответствуют выбранной теме и частным задачам работы. Рассматривается раннее развитие мозга с акцентом на регулирующие процесс механизмы. Последние, как известно сложны, многоступенчаты и во многих случаях не до конца исследованы. Автору удастся избежать «долгих рассуждений» и дать основную

пространственно-временную характеристику сигнальных путей и их взаимодействий в ходе раннего развития мозга. Отдельные главы здесь посвящены исследованию генетических мишеней ранее изученного в лаборатории гомеодоменного транскрипционного фактора *Xanf1*, а именно, малой ГТФазе *Ras-dva1* и секретлируемым белкам группы *Ag1* в развивающемся переднем мозге низших позвоночных. Второй большой раздел обзора литературы, касается регенерации, содержит основные сведения о характере восстановительных процессов у низших и высших позвоночных, а также представление основной гипотезы работы, объясняющей утрату регенерационной способности исчезновением изучаемых авторами групп генов. *К обзору литературы в целом есть небольшие замечания. Они касаются выбора затрудняющей чтение сквозной нумерации ссылок, неточностей и опечаток, а также оформления некоторых рисунков.*

В разделе «Материал и методы» приведены сведения об объектах изучения, о реактивах, оборудовании, средах, праймерах. Также здесь дано детальное описание экспериментальной работы. Большинство экспериментов (гибридизация *in situ*, ПЦР в реальном времени, гистологическая обработка) дано очень подробно. Это, в свою очередь, свидетельствует о **выполнении всех этапов работы собственно автором и приобретении им необходимых для кандидата наук квалификационных навыков.** Работа выполнена с помощью методов молекулярной биологии, спектр которых велик: блокирование эндогенных мРНК целевых генов при помощи микроинъекций, клонирование генов, гибридизация *in situ*, ОТ-ПЦР в реальном времени, получение трансгенных животных и т.д. Иммунохимические методы использованы для определения клеточной гибели и визуализации флуоресцентных белков. *Замечание к разделу «Материал и методы» - не для всех экспериментов дана полная информации о числе использованных в работе животных и о постановке контрольных тестов.*

Результаты и их обсуждение (38 стр.) приведены в совокупности, при этом раздел полностью отражает ход проделанной автором работы. Раздел состоит из двух частей, первая из которых посвящена изучению роли генов *Xag2* и *Ras-dva1* в раннем развитии мозга эмбрионов *X. laevis*, вторая – роли тех же генов в регенерации конечности и хвоста у личинок лягушки и у взрослых рыб *D. Rerio*.

В первой части показано, что малая ГТФаза *Ras-dva1* и секретлируемые белки группы *Ag1*, (наряду с такими важными регуляторами развития конечного мозга как *Xanf* и *FoxG1*) необходимы для нормального развития мозга *X. laevis*. Гибридизация *in situ* выявила область присутствия *Ras-dva1* и регуляторного фактора *FoxG1*, а также продемонстрировала ограниченную область экспрессии изучаемых генов, что косвенно свидетельствовало о не прямом, а опосредованном другим белком их взаимодействии. Далее показано, что малая ГТФаза *Ras-dva1* участвует в опосредованной активации *Ag1* генов во внешнем слое ненейральной anteriорной эктодермы, передавая сигнал от фактора *Fgf8*. Изучение областей окрашивания выявило, что область экспрессии генов *Ag1* совпадает с таковой *Ras-dva1* и что один из генов *Ag1* (*Xag2*) участвует в дифференцировке преплакодной эктодермы в передней части нервной пластинки. Интересным оказалось то, что экспрессия генов *Ag1* ограничивается внешним слоем клеток, которые, как выяснилось, не участвуют прямо в процессе развития теленцефалона (также как и *Ras-dva1*). Таким образом, секретлируемые продукты этих генов могут играть роль регулируемых малой ГТФазой *Ras-dva1* сигнальных факторов. Для проверки

утверждения автором изучено влияние подавленной экспрессии гена Ras-dva1 на активность Agr генов с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов (МО). В целом данные указали на то, что Agr являются частью сигнального каскада Ras-dva1 - Fgf8 - FoxG1, причем в этом каскаде они активируются “ниже” Ras-dva1.

Иванова А.С. изучила также, каким образом Fgf8 влияет на экспрессию Agr. Методом инъекции искусственно синтезированной мРНК гена Fgf8 удалось оценить влияние оверэкспрессии фактора на активность генов Agr, расширяющей области активности Agr в антериорной части ненейральной эктодермы и увеличение экспрессии генов Ras-dva1 и FoxG1. Подавление трансляции мРНК Fgf8a путем введения МО вело, напротив, к подавлению экспрессии генов Agr, Ras-dva1 и FoxG1. Таким образом, данные подтвердили гипотезу о том, что Fgf8a влияет на экспрессию секретлируемых белков группы Agr, активируя процесс передачи сигнала малой ГТФазой Ras-dva1.

Здесь следует отметить, что исследователям в области биологии развития хорошо известны трудности в определении места того или иного регулятора в общей, динамичной сети молекулярной регуляции развития зачатков, и уж тем более, в определении взаимодействий отдельных составляющих этой сети (включающих компоненты сигнальных путей и транскрипционные факторы). Иванова А.С., выбрав небольшой, однако ключевой фрагмент регуляции, успешно с этим вопросом справляется. В результате хорошо продуманными экспериментами доказано, что Fgf8, Ras-dva1 и Agr находятся в единой сигнальной петле обратной связи. К разделу дается четко написанное и удачно проиллюстрированное заключение, демонстрирующее модель сигнального каскада Fgf8, основанную на обмене сигналами между клетками нервной пластинки и клетками прилегающей ненейральной эктодермы. Отмечу, что основанное на полученных фактах, построение подобных схем имеет большую ценность, так как ложится в основу «написания» полной картины молекулярных взаимодействий в развитии.

Дискуссионным вопросом к этой части исследования является уровень соответствия областей окрашивания областям реальной экспрессии изучаемых генов и их продуктов (в т.ч. белков). Поскольку метод гибридизации in situ в данном разделе был основным, то в обсуждении целесообразно дать комментарий о степени его надежности. Так, например, написано «мы продемонстрировали, что Ras-dva1 экспрессируется исключительно в клетках наружного слоя ненейральной эктодермы, на границе с ANB и, таким образом, в принципе, не может регулировать экспрессию генов конечного мозга (внутренний слой клеток) с помощью автономного механизма». Эта сентенция основана на регистрации локализации продуктов реакции при in situ гибридизации, но не подкреплена данными на клеточном уровне (возможно иммуноцитохимически).

Во второй части работы изучено участие генов Agr и Ras-dva в регенерации задней почки конечности и хвоста головастиков *Xenopus laevis* и плавников *Danio rerio*. Рассмотрение роли тех же генов, что и в развитии конечного мозга, обусловлено не соображениями удобства, а является результатом обнаруженного факта исчезновения некоторых представителей генов Agr и Ras-dva в таксонах с ингибированной регенерационной способностью. Ивановой А. С. с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени проанализирована экспрессия генов Agr при

регенерации почки конечности и хвоста у головастика *X. laevis*, и результаты визуализированы с помощью метода гибридизации *in situ*. На этом автор не останавливается и проводит дополнительное изучение экспрессии генов *Agg* с помощью трансгенных эмбрионов *X. laevis*, у которых под контролем промоторов изучаемых генов находится флуоресцентный белок. Активация трансгена *Xag2-EGFP* детектировалась через 12 часов после ампутации, экспрессия *EGFP* сохранялась в первые 2 дня регенерации почки конечности и хвоста на стадиях 51-52, но исчезала в конечности (в независимых экспериментах) на поздних стадиях, когда регенерация конечности (но не хвоста) становится невозможной. К разделу дано заключение, где, в частности, сопоставляется роль в регенерации гена *Xag2*, гомологичного гену тритонов *pAG*, претендующему у этого таксона на ключевую роль в проявлении наивысшей среди позвоночных регенерационной способности. *Замечание к этой части работы – отсутствие информации о том, что происходит на 1-7 дни наиболее высокой экспрессии генов *xAgg* в сайте ампутации. Указано, что это «не рана и не воспаление», но тогда что? Выяснение этого вопроса на клеточном уровне с помощью морфологических и иммунохимических методов могло помочь увязать роль исследуемых генов с клеточным поведением, их регенерационным ответом.*

Участие генов *Agg* в регенерации плавников *Danio rerio* – еще один раздел работы, проливающий свет на роль семейства *Agg* в регенерации. Вначале проанализирована работа гена *Ag1* в раннем развитии *Danio rerio*, что дало новую независимую информацию для биологов развития. Затем проведено изучение экспрессии генов этого семейства в регенерирующих плавниках. В результате выявлены отличия в динамике экспрессии генов *Agg* при регенерации плавника в сравнении с регенерацией хвоста и почки конечности лягушек, выражающиеся в низком уровне экспрессии на ранних этапах регенерации у рыб по сравнению с лягушкой. *Попытка объяснить разноуровневую экспрессию на ранних этапах регенерации у амфибий и рыб сделана в терминах «разного расхода транскриптов на регенерацию». Это, в свою очередь, требует пояснений, т.к. регенерация представляет собой совокупность множества клеточных процессов, к тому же значительно различающихся у взрослых рыб и головастика амфибий.*

В данной части работы сделана попытка привязать экспрессию гена *Ag1* к клеточным событиям при регенерации хвостового плавника *D. rerio*. Локализация экспрессии гена *Ag1* (кодирующего секретрируемую дисульфид-изомеразу белков) в области апикальной шапочки вскоре после ампутации была расценена как доказательство роли *Ag1* в формировании blastемы. Необходимость наличия *Ag1* для восстановления плавника была показана и иным путем. При подавлении трансляции мРНК *Ag1* путем инъекции антисмысловых МО в ампутированные хвостовые плавники имело место ингибирование регенерации плавника. Интересен факт обнаружения транскриптов в зоне нормального роста плавника, близко к области ампутации. Это подтверждает универсальность генетических механизмов регуляции при развитии и регенерации. Более того, здесь проявляется феномен рекрутирования и увеличения экспрессии генов, управляющих клеточным ростом, при регенерации органа. Проведенный контроль апоптоза методом TUNEL также вполне уместен, так как гибель части клеток вносит свой понятный вклад в снижение числа синтезируемых клетками транскриптов.

Заключительная часть работы касается участия генов *Ras-dva* в регенерации у головастика *X. laevis* и плавников *Danio rerio*. Были проведены реакции ОТ – ПЦР с необходимыми для этого контролями, как для оценки эффективности регенерации у обоих видов, так и оценки при отрицательных контролях (аликвоты тех же самых образцов тотальной РНК, которые были использованы для получения кДНК, но без добавления обратной транскриптазы (контроль необходимый в случае генов *Ras-dva*)). В результате обнаружена активация генов *Ras-dva* (1 и 2) на 1-й день после ампутации и снижение экспрессии к 5-му дню. Сходная динамика была отмечена при регенерации плавников у рыб. В результате делается общий для обеих моделей корреляционный вывод об участии генов *Ras-dva* в процессе заживления раны. Однако, отметим, что первые сутки после ампутации это совокупность многих процессов, также как и собственно заживление раны. Здесь необходимо уточнение и это является хорошей перспективой работы для выяснения роли этих генов в конкретных механизмах инициации регенерации. Данные гибридизации *in situ* подтвердили результаты ОТ-ПЦР и позволили получить информацию о локализации клеток с повышенной экспрессией генов *Ras-dva* в регенерирующих органах. Здесь интересен факт высокой экспрессии (в 4 раза выше, чем в окружающих тканях) в нотохорде головастика, как известно, входящем в регуляторную «петлю», образуемую нотохордом и апикальным эпителием на ранних этапах регенерации хвоста у амфибий.

Еще один подход, получение линии трансгенных лягушек *proRas-dva1-EGFP* придаст уверенность в участии генов *Ras-dva* в восстановлении, в частности на самых ранних его этапах у *Xenopus* и *Danio* в клетках эпителия и формирующихся blastem. Для того, чтобы определить, является ли наличие *Ras-dva* (1 и 2) необходимым условием для регенерации, проведено подавление трансляции этих генов в регенерирующих хвостовых плавниках *Danio rerio* и хвостах головастика *X. laevis* с помощью инъекций смеси антисмысловых МО с флуоресцентным трэйсером FLD в эмбрионы на ст. 4-8 blastomeres (при постановке всех необходимых контролей). Данные в совокупности подтверждают то, что нормальная экспрессия *Ras-dva1* и *Ras-dva2* необходима для регенерации хвоста *Xenopus*, а при ее нарушении возможны изменения его формообразования. В целом, поскольку с помощью ОТ-ПЦР было дополнительно определено что, уровень экспрессии генов *Ag1* и *Ag2*, также как и *Fgf20* и *Fgf8* ощутимо снижается при подавлении функции генов *Ras-dva*, все говорит о существенной роли маленьких ГТФаз как в инициации, так и прогрессе регенерации.

В этой части исследования автором изучен также эффект подавления трансляции генов *Ras-dva* в регенерирующих плавниках *Danio rerio*. Были использованы особые Vivo-МО с остатком окта-гуанидин дендримера, благодаря которому они способны проникать в клетки. Обнаружено существенное подавление регенерации в инъецированной области плавника по сравнению с неинъецированной (контрольной). Интересно, что прекращение инъецирования МО восстанавливало ход регенерации, указывая на динамический характер экспрессии *Ras-dva*. Также как и на модели регенерации хвоста у *X. laevis*, методом количественного ОТ-ПЦР были показаны изменения динамики экспрессии маркерных генов регенерации *Igf2b* и *Fgf20a*, а также генов *Ag1*, в процессе регенерации хвостовых плавников *Danio*, инъецированных контрольными и *Ras-dva1* и *Ras-dva2* Vivo-МО. Ну и, наконец, логично завершающим работу этапом, выглядит попытка восстановить регенерационную способность у лягушек (в период ее

естественного подавления) с помощью сверхэкспрессии Ras-dva путем введения мРНК. Попытка в целом удалась, учитывая представленную (рис. 46) достаточную репрезентативность выборки.

В заключении к данной части работы намечается **перспектива исследований**, в основе которой лежит гипотеза об утрате высшими позвоночными гена Ag1, затем генов Ras-dva, что, в конечном счете, блокирует способность к регенерации придатков тела у млекопитающих и человека. *При обсуждении этого вопроса, однако, полагаю необходимым учитывать существующие сегодня иные объяснения наличия/утраты регенерационной способности позвоночными. В них в качестве пререквизитов регенерационной способности рассматриваются высокая пластичность клеточных фенотипов, низкая степень зрелости иммунной системы, альтернатива опухолевому росту и т.д.*

Выводы исследовательской работы Ивановой А.С. лаконичны, но при этом отражают основные результаты. Наряду с этим они с очевидностью демонстрируют глубину и фундаментальность данного исследования, что подтверждается также весомым списком публикаций автора в журналах высокого рейтинга.

Итак, несмотря на замечания, которые носят главным образом редакционный либо рекомендательный характер, работа Ивановой А.С. является большим, законченным, хорошо продуманным, выполненным современными методами исследованием, давшим новые ценные результаты. Содержание диссертации полностью соответствует указанной специальности, автореферат соответствует содержанию диссертации. Таким образом, представленная диссертационная работа Ивановой А.С. «Роль генов Ag1 и Ras-dva в раннем развитии мозга и при регенерации придатков тела у низших позвоночных» соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. – молекулярная биология.

Официальный оппонент

ИО заведующего лабораторией проблем регенерации, г.н.с.
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
Российской академии наук (ИБР РАН)

Доктор биологических наук

Григорян Элеонора Норайровна

Адрес: 119334, г.Москва, Ул. Вавилова, 26;
Телефон: +7(499)1350052;
E-mail: leonore@mail.ru

Подпись д.б.н. Григорян Э.Н.
«Удостоверяю»



Ученый секретарь
ИБР РАН к.б.н. Хабарова М.Ю.