

## ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Григорян Э.Н. на диссертационную работу Коротковой Дарьи Дмитриевны «Роль нового белка холонокровных *c-Answer* в регуляции пуриnergического и FGF сигнальных путей при регенерации и в развитии мозга», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Диссертационная работа Коротковой Д.Д. является широким молекулярно-генетическим исследованием, служащим экспериментальным доказательством и развитием оригинальной идеи, разрабатываемой в лаборатории проф. А.Г.Зарайского. Гипотеза, легшая в основу работы, заключается в том, что отличия теплокровных от холонокровных животных в отношении их регенерационных способностей могут быть обусловлены исчезновением или появлением отдельных генов в ходе эволюции позвоночных. Некоторые из таких генов были идентифицированы в лаборатории ранее, и это обстоятельство сделало целесообразным и интересным дальнейший их поиск. Подобная задача является чрезвычайно **актуальной**, как с позиций фундаментальной биологии, так и практической биотехнологии. Ее решение в конечном итоге может позволить выявить закономерности появления (исчезновения) таких генов, обнаружить группу ключевых, несущих наибольшую ответственность, как за регенерационный потенциал, так и развитие переднего мозга позвоночных животных. Это, в свою очередь, дает возможность приблизиться к решению вопроса повышения регенерационных способностей высших позвоночных и человека с помощью приемов биотехнологии.

В работе Коротковой Д.Д. решается непростой вопрос – определение физиологических и молекулярных функций одного из ассоциированных с регенерацией генов, гена *c-answer*, кодирующего специфичный для холонокровных рецептор-связывающий белок раневого эпителия. Хорошо известно, что выяснение функциональной роли того или иного гена (группы генов) – задача, не являющаяся простой, однако, именно она выбрана Коротковой Д.Д. в качестве **темы** ее диссертационной работы. В лаборатории были получены предварительные сведения об экспрессии гена *c-answer* при регенерации, а также в раннем развитии мозга шпорцевой лягушки. Однако требовалась широкая доказательная база для утверждения того, что корреляция между экспрессией данного гена и этими событиями не является случайной, но имеет в основе определенные функции, обеспечивающие как регенерационный процесс, так развитие конечного мозга.

Для реализации задуманного выбран план, изложенный в **задачах** работы,

приведенных в диссертации логично и последовательно. Этот план направлен на многостороннее изучение вопроса и включает если не все, то многие походы современных молекулярно-генетических исследований.

Диссертационная работа, изложенная на 108 стр. построена в целом по традиционному плану и открывается **введением**, изложенным Коротковой Д.Д. кратко и четко. Все основные обязательные разделы: цель, задачи, актуальность во введении присутствуют.

**В обзоре литературы**, включающем 5 глав, освещено современное состояние вопросов, имеющих непосредственное отношение к теме диссертации Коротковой Д.Д. Открывается раздел главой, посвященной генетическим механизмам эволюционных изменений у позвоночных животных, в частности, геномным дупликациям и элиминации отдельных генов. В качестве примеров исчезновения генов и связанных с этим преобразований функций и признаков организма приводятся обнаруженные ранее в лаборатории гены *Agr* и *Ras-dva*. Делается заключение, что эволюционные преобразования генных сетей, приводящие к постепенному изменению характерных признаков позвоночных и, соответственно, выделению новых групп позвоночных, как правило, обусловлены мутациями в генах, обладающих несколькими функциями. При этом гены, одной из функций которых является регуляция важных этапов эмбрионального развития, зачастую относящихся к формированию нервной системы, - как правило, консервативны и обладают высокой устойчивостью к мутациям.

Во второй главе литературного обзора анализируются механизмы развития и эволюции переднего мозга позвоночных – также важного вопроса в контексте данной работы. Дается описание процесса развития переднего мозга и известных механизмов его регуляции, в том числе и самых ранних этапов – дифференцировки отдела «по умолчанию» из эмбриональной эктодермы, за счет ингибирования факторов суперсемейства - TGF $\beta$  – BMPs. Упомянут ген *Anf*, специфичный для зачатка переднего мозга и кодирующий соответствующий белок – транскрипционный ингибитор в отношении гомеобоксных генов, ответственных за развитие постериорных отделов мозга (*otx2* и *raxb*), а также многие другие гены и белки, являющиеся молекулярными регуляторами процесса развития переднего мозга.

Интересен фрагмент главы, дающей объяснение феномена увеличения дорсальной области конечного мозга у теплокровных животных, а также роль белка – пуриnergического рецептора P2 $\gamma$ 1 в развитии глаз низших позвоночных. Предполагается, что изменение функции пуриnergического сигнального пути и исчезновение данных генов могли стать причиной различий в степени развития

переднего мозга у различных групп позвоночных – предположение, легшее среди прочих, в основу постановки темы данной диссертационной работы.

В обзоре литературы учтена и необходимость рассмотрения молекулярно-генетических механизмов ранних этапов регенерации крупных придатков тела позвоночных. Автор работы исходит из справедливых соображений, что генетические изменения, затрагивающие такие фундаментальные, высоко консервативные процессы, как те, что сопровождают развитие нервной системы, в силу их плейотропного эффекта отражаются и на других сопряженных процессах и, в первую очередь, эпиморфной регенерации, требующей активации генов и сигнальных путей, участвующих в раннем развитии. В этой связи в тексте основное внимание уделено самым ранним этапам регенерации конечности и хвоста у шпорцевой лягушки (до начала активного клеточного роста, дифференцировки и морфогенеза), как наиболее интересным и важным. В главе рассмотрены ключевые сигнальные каскады, управляющие ранними этапами регенерации придатков тела и также работающими при развитии мозга. Здесь автор диссертационной работы обращается к роли генов семейства *Ag1* и *Ras-dva*, что вполне оправдано, поскольку они изучаются в лаборатории и имеют полное право быть включенными в набор основных, известных сегодня регуляторов регенерации. Упомянуты немногие известные к настоящему времени способы эпигенетической регуляции регенерации - самого пока сложного и не разработанного в нужной мере вопроса в области исследования регенерации.

В еще одной главе обзора изложена информация о сигнальных путях, за активацию которых ответственны фактор роста фибробластов (FGF) и внеклеточные пуриновые нуклеотиды. Отмечу, что для обоих сигнальных путей и особенно для компонентов FGF сигнального пути в литературе уже накоплена обширная информация и вычленение необходимых и достаточных данных для изложения в краткой главе обзора литературы – задача непростая, с которой автор успешно справляется. Упомянута и возможность взаимодействия рецепторов P2Y и FGFR, принимающих участие во многих жизненно важных процессах, включая развитие мозга и регенерацию, возможно, опосредованное другими трансмембранными белками. Явление это пока не изучено, и дальнейшее проведение исследований в этом направлении представляет собой одну из многих перспектив работы лаборатории.

Завершается обзор разделом, посвященным технологии CRISPR/Cas9 генного нокаута, точнее особенностям его применения на модели эмбрионов *X. laevis*. Все, что связано с этим подходом - относительно недавние достижения, и разработка метода на геномах новых лабораторных объектов с учетом их особенностей – важная и

интересная задача, являющаяся передним краем современной биотехнологии.

В целом обзор литературы содержит всю необходимую информацию как по модельным процессам – ранним стадиям регенерации конечности и хвоста и развития переднего мозга у позвоночных, так и по молекулярно-генетическим регуляциям этих процессов в рамках и в аспекте поставленных в работе цели и частных задач. На первый взгляд обзор кажется слишком лаконичным, как и определенная «скупость» порой в цитировании литературы, однако в данном случае это оправдано, поскольку только в этом случае становится «прозрачной» логика, как теоретической основы работы, так и практических подходов к ее исполнению.

В разделе «**Результаты**», содержащем 7 глав и изложенном на 37 стр., в качестве первоочередной задачи работы приведено определение первичной структуры белка *c-Answer* (так раздел определен в заголовке). Однако эта часть раздела открывается описанием характеристик соответствующего гена. Результаты работы по изучению белка *c-Answer* дают достаточно полную ему характеристику как трансмембранного белка, отчасти (26%) гомологичного рецептору FGFR4. Предполагается его способность образовывать гомодимер во внутриклеточной и трансмембранной его части, сделана попытка определения его клеточной локализации.

Глава 2 раздела «Результаты» посвящена изучению экспрессии *c-Answer* в эмбриогенезе и в процессе регенерации конечностей и хвоста головастиков шпорцевой лягушки. В подробном изложении этой интересной части работы есть небольшие недочеты. Возникает вопрос, не мешало ли распознаванию специфического сигнала при гибридизации *in situ* наличие пигментированных клеток – меланофоров, присутствующих в регенерирующей ткани? В этой же главе раздела «Результаты» дана информация работы (Briggs и др., 2018) по секвенированию на уровне одной клетки. Приведенная в тексте диссертации заимствованная картинка, к сожалению, тяжело «читается», а обсуждение этой работы наряду с собственными данными уместнее было бы разместить в разделе «Обсуждение».

В главе 3.3. раздела «Результаты» приводится исследование физиологической и молекулярной функций *c-Answer* в развитии переднего мозга с помощью методов активации и ингибирования функции гена *c-answer*. Активацию проводили с помощью инъекций мРНК в эмбрионы лягушки на стадии двух-четырёх бластомеров, что в дальнейшем приводило к различным аномалиям развития. Оверэкспрессия делеционных мутантных генов *c-answer* приводила к различным, зависимым от типа мутации эффектам, затрагивающим развитие переднего мозга и глаз. Помимо влияния на уровень экспрессии специфически экспрессирующихся в этих тканях генов, часто

фенотипические изменения носили количественный характер, а именно изменение размеров тех или иных отделов мозга и глаз. Здесь уместен вопрос – были ли сделаны попытки измерений с помощью компьютера при исследовании полученных изображений развивающихся эмбрионов лягушки, выборка для подобного рода вычислений представляется вполне достаточной. Это имело смысл и в связи с утверждением, что помимо образования эктопических глаз, «происходит разрастание переднего мозга и расширение зон экспрессии генов-маркеров переднего мозга и глаз, *foxg1* и *rax*, соответственно, в результате оверэкспрессии мРНК *c-answer*» (рис. 3.1. стр.51).

Блокирование трансляции мРНК *c-answer* проводили методом инъекций в эмбрионы антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов к *c-answer* мРНК (*c-answer MO*). При этом, как и в случае оверэкспрессии внутриклеточной части *c-Answer* (*deltaN-c-answer* мРНК), наблюдали уменьшение конечного мозга и глаз у головастиков. Подавление экспрессии гена *c-answer* проводилось с помощью нокаута по двум экзонам гена посредством системы CRISPR/Cas9. С учетом необходимых контролей данная процедура имела также фенотипические последствия. В обоих случаях мутации приводили к аномалиям развития эмбрионов. Параллельно была проведена необходимая большая работа по оценке частоты мутаций в последовательности *c-answer* для 2-го и 6-го экзонов в результате нокаута *c-answer* с помощью системы CRISPR/Cas9. Несмотря на то, что число видимых эффектов при ингибировании функции гена обоими способами (*MO* и CRISPR/Cas9) было невелико, делается вывод об уменьшении переднеголовных структур (конечного мозга и глаз) у головастиков. Здесь сомнения также могли бы быть сняты количественными данными, которые могли бы быть получены с помощью обмеров изображений, и подтверждающими наблюдение.

Для изучения возможных молекулярных механизмов формирования аномалий развития у эмбрионов с активированной либо подавленной экспрессией *c-answer*, с помощью методов гибридизации *in situ* в работе исследованы изменения экспрессии широкого ряда генов - маркеров развития мозга. Показано влияние экспрессии изучаемого гена на экспрессию гомеобоксных генов-регуляторов развития глаз *rax6*, *rax*; и продукта гена - индуктора конечного мозга, фактора роста фибробластов *fgf8*. Это явилось дополнительным свидетельством роли гена и белка *c-answer* в развитии структур переднего мозга шпорцевой лягушки.

Молекулярно-генетическая работа, подобная той, что была проведена на эмбрионах шпорцевой лягушки, инъекцированных мРНК разных модифицированных

форм *c-answer* для активации, и нокаутных форм для подавления функции гена была осуществлена на модели регенерации хвоста и почки задней конечности головастиков *X. laevis*. В целом данные свидетельствуют о восстановлении при инъекции мРНК *c-answer* регенерационной способности на той стадии развития головастика, когда регенерация «в норме» уже подавлена. Приводится морфологическая картинка и гистограмма. В совокупности с результатами проведенной параллельно количественной ПЦР данные выглядят в достаточной мере убедительно, а существующие разбросы получаемых морфологических эффектов могут быть вызваны широким рядом причин, обсуждение которых неплохо было бы включить в раздел «Обсуждение».

В главе 3.5. раздела «Результаты» приведены данные о возможных взаимодействиях *c-Answer* с белками, участвующими в сигнальных каскадах, компонентами которых являются Fgf8 и FGFR4, а также АДФ и P2ry1. Данные получены методами ко-иммунопреципитации с последующим Вестерн-блоттингом. В результате удалось показать, что во взаимодействии белка *c-Answer* с FGFR1-4 и P2ry1 ключевую роль играет трансмембранный его домен и «около мембранные участки». Доказательство возможности такого взаимодействия позволило Коротковой Д.Д. изучить влияние *c-Answer* на активность FGF сигнального пути, точнее того его раздела, что приводит к фосфорилированию митоген-активируемой киназы Erk. Для измерения уровня активации с помощью белка *c-Answer* MAP/ERK сигнального пути (активируемого связыванием лиганда Fgf8 с рецепторами FGFRs) были использованы люциферазные репортерные конструкции, которыми инъецировали эмбрионов *X. laevis* на стадии двух бластомеров. Затем на стадии 10 развития эмбрионов у них забирали анимальные области и культивировали до стадии 11 (ранняя гастрюла), после чего измеряли активность люциферазы. Результаты хотя и косвенно, но достаточно убедительно демонстрировали взаимодействие с рецепторами FGFRs, что в свою очередь свидетельствовало о том, что *c-Answer* оказывает стимулирующее влияние на MAP/ERK сигнальный путь. Здесь следует отметить, что, судя по гистограмме наиболее четкое (достоверное) стимулирующее влияние исследуемый белок оказывает в совокупности с fgf8, действие *c-Answer* само по себе обладает только незначительным эффектом, достоверность которого при сравнении с контролем на рисунке не обозначена.

В работе Коротковой Д.Д. исследовано также влияние *c-Answer* на Ca<sup>2+</sup>-зависимый пуринаргический сигнальный путь, приводящий к активации митоген-активируемой киназы Erk. Для этого была разработана техника детекции уровня ионов

кальция в культуре клеток зародышей, ко-экспрессирующих *c-Answer* и рецептор P2ry1, с помощью Ca<sup>2+</sup>-сенсора Case12. В результате по данным количественных измерений удалось установить, что *c-Answer* оказывает стимулирующее влияние на Ca<sup>2+</sup>-зависимый пуринергический сигнальный путь, модулируя работу пуринового рецептора P2ry1 на стадии средней гаструлы. Наибольший по сравнению с контролями сигнал был получен при введении сенсора + рецептора P2ry1 + *c-answer*.

В обоих изученных случаях активации двух различных сигнальных путей, приводящих к общему эффекту - к активации MAP/ERK сигнального пути, как следствие, нужно предполагать повышение пролиферативной активности клеток апикального отдела гаструлы *X. laevis*. Данных этих в работе нет (правда исходно и не ставилась такая задача), хотя получение сведений по клеточной пролиферации напрашивается само собой, так как, как минимум на уровне визуального анализа, показано увеличение размеров переднего мозга и глаз под действием оверэкспрессии мРНК *c-answer*. Рассуждения на эту тему – возможное увеличение размеров структур через увеличение пролиферативной активности благодаря активации MAP/ERK сигнального пути за счет оверэкспрессии *c-answer*, хотелось бы увидеть в разделе «Обсуждение результатов».

В целом же раздел «Результаты» является весомым, демонстрирующим полномасштабное исследование и высокий профессионализм его исполнителя. Сделанные замечания должны быть расценены не как ошибки работы, а как рекомендации для продолжения данного исследования, его перспективы.

Поскольку работа на соискание степени кандидата наук является в первую очередь квалификационной, в этой связи уместен вопрос - все ли разделы работы выполнялись диссертантом или были привлечены дополнительные силы. Сомнений нет в самостоятельности и профессионализме автора работы, но поскольку работа велика и по объему и числу различных, достаточно непростых методов, хоть какие-то разъяснения по этому вопросу были бы уместны.

Раздел «Обсуждение результатов» - невелик -7 страниц. Указано, что данные, полученные в ходе проведенных экспериментов, свидетельствуют о том, что белок *c-Answer* контролирует раннее развитие головного мозга и регенерацию у шпорцевой лягушки путем взаимодействия с рецепторами FGFR4 и P2ry1 и модуляции их активности. В обсуждении на основании результатов по использованию различных делеционных мутантных форм белка рассматриваются различия доменов белка *c-Answer* по их функциональной роли и по характеру взаимодействия с рецепторами FGFR4 и P2ry1. Предполагается, что эти особенности изучаемого белка делают его

уникальным по своим свойствам. Коротко затрагивается вопрос возможного взаимодействия гена *c-answer* с другими, исследованными в лаборатории генами *ag1* и *ras-dval*, также ассоциированными с регенерационной способностью и развитием переднего мозга у холоднокровных животных. Детально обсуждается вопрос связи гена *c-answer* с развитием вентральной, характерной для низших позвоночных области и значение отсутствия гена в развитии дорсальной части мозга, характерного для высших позвоночных. Предполагается, что потеря *c-Answer* предками высших позвоночных могла привести к снижению у них уровня экспрессии FoxG1 в дорсальной части конечного мозга. В результате клетки этой части мозга могли получить свободу в выборе направления дифференцировки, которая ранее диктовалась высоким уровнем экспрессии FoxG1. В итоге в эволюции были созданы условия для развития новых структур мозга, характерных для птиц и млекопитающих. Тем самым в «обсуждении» устраняется кажущееся на первый взгляд противоречие - положительной связи гена *c-answer* с регенерацией и развитием конечного мозга у низших и утратой этого гена у животных с прогрессирующим развитием переднего мозга - у высших позвоночных.

Большой интерес вызывают данные о стимулирующем действии *c-Answer* на активность *P2gy1*, позволяющем предполагать, что потеря *c-Answer* в эволюции теплокровных животных могла привести к существенным перестройкам механизмов развития связанных с функционированием рецептора *P2gy1* – структур переднего мозга и глаз.

Использованные в диссертационной работе Коротковой Д.Д. подходы могли бы быть в перспективе применены и в отношении вопросов регенерации сетчатки и других структур глаза у низших позвоночных, в том числе шпорцевой лягушки. То же относится и к вопросам роли *c-Answer* в регуляции сигнального пути FGF – ключевой молекулы в регенерации сетчатки глаза у всех позвоночных. За пределами данного краткого обсуждения осталось много интересных вопросов, однако, в целом работа органично поддержала развиваемую в лаборатории теорию о связи потери ряда генов с потерей регенерационных способностей, а также с развитием переднего мозга у высших позвоночных, пополнив число таких генов.

Роль генов в различии регенерационных способностей высших и низших позвоночных животных, безусловно, основополагающая. Однако известны многие сопутствующие обстоятельства на разных уровнях у позвоночных (от популяционного до клеточного), способствующих регенерации у рыб, амфибий и рептилий, и, напротив, не позволяющие развитию регенерационного процесса. В современной литературе рассматриваются особенности гормональной регуляции развития низших позвоночных,



их иммунной системы, высокого уровня клеточной пластичности, высокой скорости элиминации стареющих клеток, особенностей эпигенома и другие причины больших регенерационных способностей низших позвоночных. Эти причины нельзя игнорировать, и было бы интересным увидеть обсуждение связи исследуемого гена/белка (изучаемой генетической особенности) с названными, иными предполагаемыми особенностями низших позвоночных, обуславливающими их высокий регенерационный потенциал. Известна многофункциональность как генов, так и белков, она в работе в отношении c-answer также не обсуждается, надо думать за недостатком пока сведений по этому вопросу. Их получение также является интересной перспективой работы Коротковой Д.Д.

**Выводы в полной мере** отражают полученные результаты, четко сформулированы.

Список использованных в работе Коротковой Д.Д. **методов** внушительен. Все методы адекватны для решения поставленных в работе задач. Отдельно отмечу высокотехнологичный и современный их уровень, требующий многих знаний, умений и навыков, что, повторяюсь, отражает квалификацию диссертанта. Замечание относится к отсутствию (в большинстве случаев) описания контролей и числа повторов экспериментов. Другая претензия – неудачное размещение раздела «Материал и методы» в конце манускрипта. Оказалось, что обращаться к деталям выполнения экспериментов каждый раз в конец диссертации - довольно сложно.

**Список литературы** представлен 114-ю ссылками, в нем есть мелкие недочеты: отсутствие в ряде случаев тома и номера журнала (ссылки: 35, 41, 47, 53, 60, 78 и др.).

Все сделанные замечания к работе Коротковой Д.Д. никак не могут снизить высокой ее оценки. В целом работа представляет собой сложное, полномасштабное исследование гена и белка c-answer, а также их функций и роли в развитии переднего мозга и регенерации у шпорцевой лягушки. Все выводы исследования сделаны только в результате получения экспериментальных, последовательных доказательств, достоверны и обоснованы. Работа является большим, законченным, хорошо продуманным и тщательно выполненным исследованием, давшим новые ценные результаты, и составившим в конечном итоге целое направление. Оно имеет две взаимосвязанные ценности: фундаментальную и практическую. Содержание диссертации полностью соответствует указанной специальности, автореферат соответствует содержанию диссертации. Таким образом, работа **«Роль нового белка холоднокровных c-Answer в регуляции пуринэргического и FGF сигнальных путей при регенерации и в развитии мозга»** полностью соответствует всем

требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор **Короткова Дарья Дмитриевна** заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент, Главный научный сотрудник  
лаборатории Проблемы регенерации  
ФГБУН Институт биологии развития  
им. Н.К.Кольцова Российской академии наук,  
доктор биологических наук-

Григорян Элеонора Норайровна

Ул. Вавилова, 26; 119334 Москва, Россия  
E-mail: [leonore@mail.ru](mailto:leonore@mail.ru),  
Телефон (раб.): +7(499)1350052

Подпись д.б.н. Григорян Э.Н.  
«Удостоверяю»  
Ученый секретарь ИБР РАН  
кандидат биологических наук



  
Хабарова Марина Юрьевна

11 мая 2020 г.