

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Коротковой Д.Д. «Роль нового белка холоднокровных *c-Answer* в регуляции пуриnergического и FGF сигнальных путей при регенерации и в развитии мозга», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Диссертационная работа Коротковой Д.Д. посвящена изучению роли неизвестного ранее гена *c-answer* в контроле двух ключевых морфогенетических процессов – в развитии головного мозга и при регенерации крупных придатков тела позвоночных животных. Хотя исследования выполнены на шпорцевой лягушке (*Xenopus laevis*), выпадение гена *c-answer* из генома высших позвоночных (принципиально отличающихся от холоднокровных по способности к регенерации и особенностями развития центральной нервной системы) определяет высокую значимость результатов работы диссертанта для понимания механизмов контроля этих процессов также и у высших позвоночных, включая человека.

Исследование механизмов развития какого-либо органа или ткани в процессе эмбриогенеза, на мой взгляд, является одним из наиболее эффективных подходов к выявлению базовых принципов, определяющих функциональность этого органа, и, следовательно, способствует успешной разработке методов терапевтического воздействия на его функции. В полной мере это относится и к исследованиям молекулярных сигнальных каскадов, определяющих развитие нервной системы и изменение способности к регенерации в онтогенезе, представляющим собой актуальное и активно развивающееся направление экспериментальной биологии. В своей работе Короткова Д.Д. не только высокопрофессионально использует этот традиционный подход, но и сочетает его с методами эволюционной генетики, привнося эволюционный аспект в понимание генетической взаимосвязи между такими разными биологическими процессами как регенерация и формирование нервной системы - учитывая отсутствие гена *c-answer* в геномах теплокровных (высших) позвоночных, данная работа может помочь как пониманию причин снижения их способности к регенерации, так и причин резкого повышения функциональности их центральной нервной системы.

Необходимо также ещё раз подчеркнуть, что работа посвящена исследованию ранее не известного гена, существование и функциональность которого были впервые показаны диссертантом. Это значительно повышает научный уровень и новизну работы, которая может способствовать формированию новых направлений исследований в области нейроэмбриологии и регенеративной биологии (например, разработка новых подходов к стимуляции регенеративных процессов в тканях млекопитающих и человека).

Таким образом, тема диссертационной работы Коротковой Д.Д. безусловно является актуальной и будет способствовать дальнейшему прогрессу в изучении молекулярных механизмов раннего развития мозга и регенерации.

Диссертация Коротковой Д.Д. построена по стандартной схеме и включает в себя следующие основные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, список литературы. Материал диссертации изложен на 108 страницах и содержит 31 рисунок. Список литературы содержит ссылки, как на классические статьи, так и на современные работы. В целом, оформление диссертации соответствует требованиям, установленным Министерством образования Российской Федерации. Обнаруженные в диссертации немногочисленные опечатки не снижают положительного впечатления от работы.

Раздел «Обзор литературы» состоит из 5-ти частей. Первая часть посвящена описанию генетических механизмов эволюционных изменений у позвоночных. Во второй и третьей частях обзора представлен обзор молекулярно-генетических механизмов развития переднего мозга у позвоночных и их эволюции, а также механизмов ранних этапов регенерации крупных придатков тела у различных классов позвоночных. Четвертая часть посвящена описанию сигнальных путей, активируемых факторами роста фибробластов и внеклеточными пуриновыми нуклеотидами, которые являются важными регуляторами раннего развития мозга и регенерации. В пятой части описаны особенности применения технологии CRISPR/Cas9 генного нокаута на модели эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Обзор написан хорошим языком и представляет собой детальный анализ имеющихся на сегодняшний день данных как по механизмам регуляции формирования конечного мозга, так и по молекулярным аспектам процесса регенерации у холоднокровных позвоночных. Данный раздел диссертации характеризуется достаточно широким охватом материала и включает

данные молекулярно-биологических, эмбриологических и эволюционно-генетических исследований, причём наибольшее внимание уделено самым последним публикациям, характеризующим современное состояние затрагиваемой диссертацией проблематики. На мой взгляд, некоторые разделы выполненного Д.Д. Коротковой обзора литературы заслуживают (при соответствующей доработке) опубликования в качестве отдельных обзорных статей в отечественной научной периодике.

Раздел «Материалы и методы» дает подробное описание использованных в работе методов. Автор демонстрирует владение широким спектром самых современных методов молекулярной биологии и визуализации, включая методы микроинъекций, гибридизации *in situ*, количественной ОТ-ПЦР, флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Особого внимания заслуживает эффективное использование автором метода генного нокаута CRISPR/Cas9, являющегося одним из наиболее перспективных инструментов модуляции уровня экспрессии таргетных генов. Раздел написан обстоятельно и содержит исчерпывающую информацию для воспроизведения всех выполненных автором экспериментов.

Раздел «Результаты», содержащий описание экспериментальной части выполненной автором работы, состоит из 7 глав.

Первая глава посвящена исследованию первичной структуры белка *c-Answer* на модели шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. В этой главе было показано, что белок *c-Answer*, является трансмембранным рецептором с высокой степенью гомологичности рецептору факторов роста фибробластов FGFR4 (особенно в области иммуноглобулиновых доменов внеклеточных частей, а также в аргинин- и лизинбогатых областях юкстамембранных доменов и в трансмембранных доменах этих двух белков). Трансмембранная локализация *c-Answer* была подтверждена конфокальной микроскопией клеток нейроэктодермы зародышей шпорцевой лягушки, предварительно инъецированных гибридной мРНК *c-answer* и флуоресцентного белка EGFP. На основании анализа структуры белка *c-Answer* было также сделано предположение о его способности к формированию гомодимера.

Во второй главе проведен анализ экспрессии *c-answer* (на уровне м-РНК) в ходе эмбриогенеза шпорцевой лягушки и в процессе регенерации крупных придатков тела у головастиков шпорцевой лягушки. В этой главе автором (с использованием метода гибридизации *in situ*) было показано, что наиболее выраженная экспрессия *c-answer* в

ходе эмбриогенеза наблюдается в дорсальной эктодерме: в зачатке переднего мозга, нервной пластинке и преплакодной эктодерме. Кроме того, автором была выявлена активация экспрессия гена *c-answer* в раневом эпителии и бластеме регенерата на начальных стадиях регенерации (в течение первого дня после ампутации) с постепенным снижением количества его мРНК до базового уровня к пятому дню. В целом, полученные данные прямо указывают на потенциальную роль *c-answer* в контроле процессов развития переднего мозга и регенерации ампутированных придатков тела.

Третья и четвертая главы посвящены изучению молекулярных и физиологических функций *c-Answer* в процессах развития переднего мозга и регенерации придатков тела у зародышей *X. Laevis* с использованием методов активации и подавления активности этого белка. Автором убедительно показано, что оверэкспрессия белка *c-Answer* стимулирует процессы развития переднего мозга и вызывает расширение зон экспрессии генов-маркеров переднего мозга и глаз (*raxb*, *rax*, *otx*, *engrailed*, *fgf8*, *six3*). Блокирование активности *c-Answer* двумя различными методами (инъекции антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов к *c-answer* мРНК и подавление экспрессии гена с помощью системы CRISPR/Cas9) показало достоверное уменьшение размера переднеголовных структур (конечного мозга и глаз) у головастика.

Автором так же было показано, что активация экспрессии белка *c-Answer* на стадиях развития 45-47 («рефрактерный период» когда головастики не способны к регенерации) приводит к восстановлению способности к регенерации ампутированного хвоста. Вместе с тем, инъекции антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов к *c-answer* на стадиях развития 40-44 (когда головастики в способны регенерировать хвосты) вызывали достоверное ингибирование регенерации. Этот эффект сопровождался значительным снижением уровня экспрессии генов-маркёров регенерации у земноводных (*fgf20*, *agl*, *wnt5a*, *ras-dval*). Все эти результаты подтверждают выдвинутое автором на основании анализа паттерна экспрессии *c-Answer* предположение о важной роли данного белка в регуляции развития переднего мозга и регенерации придатков тела.

В пятой главе приведены результаты экспериментов по установлению возможных белковых партнеров *c-Answer*, полученные с помощью ко-иммунопреципитации с

последующим вестерн-блоттингом. Автором было показано, что с-Answer способен связываться с рецепторами двух различных типов – рецепторами факторов роста фибробластов FGFR1-4 (RTK) и рецептором внеклеточных пуриновых нуклеотидов P2ry1 (GPCR), при этом приводятся данные о том, что основную роль в связывании играет трансмембранный домен с-Answer.

В шестой и седьмой главах автором было продемонстрировано, что с-Answer способен не только связываться с рецепторами FGFR1-4 и P2ry1, но и оказывать стимулирующее воздействие на работу данных рецепторов. С использованием люциферазных репортерных конструкций, специфичных к сигнальным путям, запускаемым при активации рецепторов FGFR1-4 и P2ry1, автору удалось показать, что в присутствии с-Answer происходит повышение уровня активности данных сигнальных путей по сравнению с обычным уровнем их активности. Эти результаты показывают, что с-Answer играет роль модулятора активности рецепторов FGFR1-4 и P2ry1 и, соответственно, контролируемых ими fgf-зависимого и пуринэргического сигнальных путей.

Таким образом, в ходе выполнения представляемой к защите работы автором были исследованы структура, механизмы действия и физиологические функции нового белка с-Answer и установлено его модулирующее действие на fgf и пуринэргический сигнальные пути. Было показано, что путём модуляции данных сигнальных путей с-Answer оказывает стимулирующее действие на развитие переднего мозга и регенерацию крупных придатков тела у позвоночных, что подтверждает выдвинутую автором гипотезу о том, что исчезновение или появления ряда генов в ходе эволюции позвоночных могло быть движущим фактором прогрессивного развития мозга в обмен на снижение регенерационных способностей.

В целом, работа выполнена на самом высоком международном уровне. По своей новизне, оригинальности основной идеи исследования, чёткости постановки задач и комплексности используемых методологических подходов представляемая к защите работа является уникальной и значительно превосходит средний уровень защищаемых по той же специальности кандидатских диссертаций. Вместе с тем, как и к любой другой работе, к представленному на защиту исследованию есть некоторые замечания или, скорее, вопросы, на которые текст диссертации не даёт достаточно чёткого ответа. Эти остающиеся вопросы никоим образом не влияют ни на значимость экспериментов,

ни на выводы работы и, в большей части, представляют собой пожелания для дальнейшей работы автора.

В частности:

1. При оценке влияния уровня активности *c-answer* на экспрессию генов, регулирующих регенерацию, для анализа было выбрано 8 генов: *fgf20*, *agl*, *wnt5a*, *ras-dva1*, *fgf8* и *msx1b*. Эти гены, безусловно, определённым образом связаны с регенерацией у земноводных, однако, пожалуй, только *wnt5a* является классическим «маркёром» этого процесса. Похоже, что критерием отбора автором генов для анализа было просто удобство, поскольку лаборатория диссертанта работает с этими генами много лет и методы анализа их экспрессии, очевидно, хорошо отлажены. На мой взгляд, в экспрессионный анализ в этом разделе работы было бы полезно так же включить гены из сигнальных каскадов Notch, BMP, TGF β или Shh.

2. В тексте диссертации указано, что молекулярный каскад, запускаемый Fgf рецепторами, активирует, по-крайней мере, три внутриклеточных сигнальных пути: фосфорилирование митоген-активируемой киназы Erk через активацию ГТФазы Ras, активацию фосфолипазы-C гамма и активацию фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K). Однако в работе (для подтверждения изменений в активности Fgf каскада) оценивалось влияние *c-Answer* только на Erk киназу, хотя (в плане регенерации) оценка воздействия на PI3K могла бы быть даже более показательной. Рационального объяснения, почему для анализа было выбрано именно (и только) фосфорилирование Erk в тексте не приводится.

3. Не совсем ясными остаются также и основания для выбора пуриnergического сигнального пути в качестве одной из двух основных мишеней активности *c-answer*. Вопросов по поводу выбора FGFR4 нет, а вот чёткого объяснения логики выбора P2ry1 в тексте не приводится (хотя этот выбор, судя по результатам, сделан был совершенно верно).

4. Автором было убедительно показано увеличение транскрипции *c-answer* в эпителии хвоста в первые сутки после ампутации. Однако остаётся не ясным, присутствуют ли транскрипты *c-answer* в эпидермисе до ампутации? То есть, происходит ли при ампутации локальное увеличение транскрипции или транскрипция *c-answer* в раневом эпителии инициируется *de novo*? Неясность ответа на этот вопрос порождает и другой вопрос: автором показано, что экспрессия *c-answer* «наиболее

выражена» в дорсальной эктодерме (presumptive neuroectoderm?). А имеет ли она место (пусть менее выражено) в покровной эктодерме (presumptive epidermis)?

5. Было бы чрезвычайно интересно осуществить генетическое профилирование тканей головастика при подавлении и активации транскрипции/трансляции *c-answer* методами гибридизации на микрочипах (microarray) или высокопроизводительного параллельного секвенирования РНК (RNA-Seq). Подобный масштабный и трудоёмкий эксперимент, очевидно, является излишним для данной работы, но его осуществление действительно могло бы дать новый импульс исследованиям процессов морфогенеза нервной системы и регенерации тканей. Надеюсь, подобные исследования будут проведены автором в ходе дальнейшего изучения функций *c-answer*.

Эти несколько остающихся вопросов никак не влияют на высочайший методологический уровень данной работы и её несомненную информативную значимость как для нейроэмбриологии, так и для регенеративной биологии. На мой взгляд, представленная работа является прекрасным примером классического эмбриологического исследования, последовательно и обстоятельно раскрывающего тонкие механизмы регуляции процессов развития и регенерации. Несомненным преимуществом данной работы, положительно отличающим её от большинства других исследований в этой области, является сочетание классической эмбриологии с эволюционной генетикой, что даёт уникальную возможность экстраполировать результаты, полученные на холоднокровной модели (*X. laevis*) на высших позвоночных, включая человека.

Таким образом, на основе изучения диссертации и опубликованных работ по теме диссертации, я могу заключить, что диссертационная работа Коротковой Д.Д. актуальна по своим задачам и содержанию, и является логически завершённым исследованием, выполненным на самом современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы получены впервые, непосредственно диссертантом, и опубликованы в ведущих рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень журналов и изданий, утвержденных Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов сомнений не вызывает.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нём

правильно отражены основные идеи и выводы диссертации, новизна и практическая значимость результатов исследований.

Все вышеизложенное позволяет мне заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения и научной значимости диссертационная работа Коротковой Дарьи Дмитриевны «Роль нового белка холоднокровных с-Answer в регуляции пуринэргического и FGF сигнальных путей при регенерации и в развитии мозга» полностью соответствует требованиям, изложенным в пунктах 9-11, 13 и 14 действующего «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации 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 её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. – молекулярная биология.

Официальный оппонент,
кандидат биологических наук,
начальник лаборатории биосовместимых
матриц и тканевой инженерии
НИЦ «Курчатовский Институт»

Пантелеев Андрей Александрович

А.А. Пантелеев

Адрес: 123098 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.
Телефон: +7 (499) 196-95-39
E-mail: a.a.pantel@gmail.com

Подпись к.б.н. Пантелеева Андрей Александровича
заверяю:

Заместитель директора по научной работе
НИЦ «Курчатовский Институт»



П.А. Форш

3 сентября 2020 г.

МП