

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования

«Санкт-Петербургский
государственный университет»

С.В.Микушев

2024 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» на диссертационную работу Орлова Евгения Евгеньевича «Секретируемая металлопротеиназа Mmp3 как регулятор скейлинга системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»

Актуальность темы исследования

Способность к регуляции – одно из основных свойств развития практических всех животных. Несмотря на то, что степень выраженности этого феномена может заметно различаться в пределах различных таксонов, для многих видов показана эмбриональная регуляция, в том числе развитие полноценных, пусть и уменьшенных в размерах, личиночных и/или ювенильных форм из отдельных изолированных бластомеров или части раннего зародыша. Вопрос о механизмах эмбриональной регуляции является одним из ключевых вопросов биологии развития. Процесс масштабирования или скейлинга, т.е. пропорциональное изменение зачатков в зависимости от размера зародыша, является результатом самоорганизации и регуляции морфогенетических полей вследствие взаимодействия множества клеток с помощью внеклеточных сигналов. Несмотря на то, что методы молекулярной биологии довольно длительное время успешно применяются в области биологии развития, выяснение молекулярной природы механизмов межклеточных взаимодействий, осуществляющих регуляцию пропорций всего зародыша, до сих пор является нетривиальной задачей. Изучение новых элементов механизмов эмбриональной регуляции с участием генов-скейлеров, обладающих размер-чувствительной экспрессией, представленное в диссертационной работе Евгения Евгеньевича Орлова, безусловно, имеет высокую значимость и актуальность для

фундаментальных исследований в различных областях биологии, и прежде всего биологии развития.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В работе Е. Е. Орлова постулируется наличие в зародышах скейлеров – белков с сильно меняющейся концентрацией в эмбрионах уменьшенного размера. На основе данных изучения моделей эмбриональной регуляции, опубликованных ранее, дается обоснование этой гипотезы. В ходе выполнения экспериментальной части работы диссертантом была разработана оригинальная методика массового получения зародышей половинного размера из разделенных бластомеров шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, впервые проанализированы транскриптомные данные таких эмбрионов. В результате анализа среди дифференциально экспрессирующихся генов был найден скейлер – матриксная металлопротеаза-3. В работе впервые показано, что подавление функции *mtpr3* у нормальных зародышей приводит к уменьшению размеров параксиальной мезодермы (мезодермы сомитов) и формирующейся нейральной пластинки, как это наблюдается в эмбрионах половинного размера, а усиление функции – к обратным эффектам. В ходе исследования также было впервые продемонстрировано, что матриксная металлопротеаза-3 регулирует разметку дорзо-вентральной оси зародыша при изменении размера последнего. Таким образом, была подтверждена предложенная гипотеза о том, для саморегуляции системы, реагирующей на размер зародыша, требуется модулятор, концентрация которого сильно изменяется в зависимости от размера эмбриона. Представленный в работе новый подход может быть применен и к другим модельным объектам с целью поиска иных модуляторов морфогенетических градиентов. Важно отметить, что автором были обнаружены два новых субстрата для матриксной металлопротеазы-3, ответственные за регуляцию вдоль дорзо-вентральной оси. Идентификация новых субстратов такого важного для организма человека фермента, безусловно, может иметь большое значение для изучения патологических процессов, в которые вовлечена матриксная металлопротеаза-3.

Структура и содержание работы, степень обоснованности полученных результатов

Диссертация изложена на 151 странице и имеет следующие разделы: список сокращений, введение, актуальность темы исследования, научная новизна и практическая значимость работы, цель и задачи исследования, обзор литературы, результаты, обсуждение, выводы, материалы и методы, список литературы, состоящий из 294 ссылок на первоисточники (с учетом отсутствующего под номером 59). Работа содержит 39 рисунков и 7 таблиц.

В разделе «Введение» автор дает краткое описание феномена эмбриональной регуляции и развернутое резюме проведенного исследования и полученных результатов.

Раздел «Обзор литературы» занимает 60 страниц и состоит из нескольких подразделов. Часть материала автор посвящает истории становления экспериментальной эмбриологии, открытию феномена эмбриональной регуляции, феномену эмбриональной индукции, роли организатора Шпемана в развитии амфибий и его аналогов у других животных, постепенно переходя к молекулярным механизмам дорзо-вентральной разметки на примере известных моделей эмбриональной регуляции. Обзор литературы написан понятно и дает хорошее представление об основных вопросах, связанных с темой диссертации.

Раздел «Результаты» состоит из 8 частей. Следует заметить, что он включает в себя заметный объем элементов дискуссии. В первой части этого раздела анализируются известные модели эмбриональной регуляции и делается вывод, что все они требуют присутствие молекулярного фактора с резко меняющейся концентрацией. Во втором разделе описаны опыты по получению разделенных надвое эмбрионов из отдельных бластомеров шпорцевой лягушки и последующему NGS-секвенированию мРНК, приводятся сведения о репертуаре дифференциально экспрессирующихся генов в интактных и уменьшенных зародышах. В третьей и четвертой частях приведены характеристика экспрессии и данные исследования функции *mtmp3*, одного из генов, выявленных в результате анализа дифференциальной экспрессии на основе транскриптомов целых и разделенных надвое зародышей. Показано участие этого гена в регуляции размеров зачатков вдоль дорзо-вентральной оси в уменьшенного зародышах. В пятой части продемонстрирован поиск и приведены результаты обнаружения новых субстратов для фермента *Mmp3*, ответственных за паттернирование вдоль дорзо-вентральной оси – белков из семейств *Noggin* и *Tolloid*. Далее автором показано, что снижение активности *Mmp3* в уменьшенных зародышах приводит к накоплению протеазы *Tolloid-like1*, что вызывает дополнительный протеолиз хордина – одного из важных морфогенов, задействованных в раннем эмбриогенезе и ответственных за формирование дорзо-вентральной оси. В седьмой части анализируется вклад каждого из обнаруженных субстратов в наблюдаемые эффекты нормализации дорзо-вентральной разметки, обозначаемые автором «переразметкой», у уменьшенных зародышей: накапливающиеся в таких эмбрионах белки *Noggin* преимущественно ответственны за утолщение хорды (т.н. «антискейлинг»), а белок *Chordin*, расщепляющийся в уменьшенных зародышах, ответственен за сужение более латеральных эктодермальных и мезодермальных структур – нейроэктодермы и мезодермы сомитов, соответственно. И, наконец, в восьмой части на основе полученных экспериментальных данных автором произведено моделирование происходящих в уменьшенных зародышах процессов. Постулаты выдвинутой модели были затем дополнительно подтверждены анализом градиента активности BMP-каскада в зависимости от активности *Mmp3* в нормальных и уменьшенных зародышах.

Все полученные в работе данные наглядны, статистически обоснованы и не вызывают сомнений.

В коротком разделе «Обсуждение» формулируется новая гипотеза о различных механизмах дифференцировки клеток на дорсальном и вентральном полюсах зародыша амфибий, что требует дальнейшей экспериментальной проверки. Этот раздел по стилю больше соответствует заключению, что оправдано в связи наличием элементов дискуссии в разделе «Результаты».

Раздел «Материалы и Методы» содержит полный список реактивов, оборудования и прочих материалов, использованных в работе. Автором описан широкий набор задействованных экспериментальных, молекулярно-биологических, биоинформатических и иммуногистохимических методов, либо даны ссылки на опубликованные оригинальные протоколы. Все использованные в работе методы адекватны поставленным задачам и характеризуют высокий уровень компетенций автора диссертации.

Выводы

Выводы состоят из 6 пунктов и полностью соответствуют целям и задачам работы, а их достоверность не вызывает сомнений.

Общие замечания и вопросы

В целом диссертационная работа Орлова Евгения Евгеньевича написана хорошо и включает в себя все необходимые разделы. В ней использованы современные методы и проведена статистическая обработка данных. Результаты, полученные в работе, приоритетные и очень важны для дальнейших исследований ключевых проблем биологии развития. Работа возражений не вызывает, однако к тесту диссертации имеются некоторые вопросы и небольшие замечания.

Так, в манускрипте встречаются неоправданно повторяются слова в одном и том же предложении или в двух последовательных (например, «...мезодерма также дифференцируется вдоль дорзо-вентральной оси вдоль градиента активности BMP-каскада...»). Некоторые фразы или предложения построены неудачно (например, «Несмотря на то, что гипотеза Ру была экспериментально опровергнута на моделях амфибии и морского ежа, наличие мозаицизма в развитии животных было подтверждено во многих других случаях, несмотря на неудачный опыт Ру», «идентифицирована группа из генов», «эмбрионы оплодотворялись»). Опечатки встречаются редко.

Имеются некоторые неточности в терминологии. Так, определение эмбриональной регуляции, данное автором во введении (восстановление нормальной структуры эмбриона после искусственного изменения его размеров), несколько сужено, поскольку сам термин подразумевает любые события восстановления недостающих структур и нормального хода развития на всех стадиях эмбриогенеза. Диссертант использует словосочетание

«дорсо-вентральная асимметрия», хотя следовало бы говорить об осевой организации, а не об асимметрии. Из уважения к автору открытия правильнее употреблять термин «организатор Шпемана» вместо «шпемановского организатора». Кроме того, не следует использовать этот термин по отношению к моделям за пределами класса амфибий, где уместно говорить об лишь аналогах организатора Шпемана. Не совсем понятна суть используемого словосочетания «шпемановская индукция». Г. Шпеман описал множество событий индукции на разных моделях, поэтому требуется уточнение, о чем идет речь. В тексте встречаются и другие неточности, например, *Tubifex tubifex* не полихета, а олигохета. Не всегда написание названий генов следует общепринятым правилам. Всем хорошо понятный термин «хорда» часто заменяется на «нотохорд», хотя в российской традиции сравнительной анатомии животных нотохорд – небольшое слепое выпячивание кишки, поддерживающее основание хоботка у Полухордовых (Hemichordata).

В разделе «Материалы и методы» не все методики описаны полно. Это компенсируется ссылками на статьи с опубликованными оригинальными протоколами, однако для читателя такая форма изложения не совсем удобна.

Обилие элементов дискуссии в разделе «Результаты», с одной стороны, облегчает понимание общей стратегии исследования, с другой стороны, затрудняет восприятие собственных результатов диссертанта. Название Рис. 36 (Предполагаемая схема формирования зачатка нотохорда белками Chordin и Noggin1/2) не отражает сути представленной схемы, поскольку речь идет о пороговых значениях белков Chordin и Noggin1/2, предположительно необходимых для формирования зачатка хорды у зародышей нормального и уменьшенного размера.

В замечательных экспериментах по изучению зависимости экспрессии *mmp3* от размера зародыша, был использован метод получения уменьшенных эмбрионов шпорцевой лягушки с помощью бисекции бластулы. Хотелось бы узнать, в чем преимущество этого метода в данном случае и приводился ли сходный анализ на уменьшенных зародышах, полученных путем деления бластомеров на 2-клеточной стадии. Интересным было также бы уточнить, в какое время после оплодотворения производили инъекцию морфолино, в ходе кортикальной ротации или после нее?

Приведенные выше замечания и вопросы не снижают ценность диссертационной работы и значимость полученных результатов.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа «Секретируемая металлопротеиназа Mmp3 как регулятор скейлинга системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*» является законченным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком научном

и методическом уровне и полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539), а ее автор, Евгений Евгеньевич Орлов, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу Орлова Е.Е. обсужден и утвержден на заседании кафедры эмбриологии СПбГУ (18 января 2024 года, протокол № 1/2024).

Отзыв составлен:

Костюченко Романом Петровичем
доцентом, кандидатом биологических наук по специальности
03.00.11 – эмбриология, гистология и цитология,
доцентом кафедры эмбриологии,
и.о. заведующего кафедрой эмбриологии федерального
государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Подпись заверяю

Подпись *Костюченко Р.П.*
ЗАВЕРЯЮ
Сек. ОК М. Фролова Е.Е.
18.01.2024.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9

Телефон: (812)328-97-01

Адрес электронной почты: [spb@spbu.ru](mailto:spbu@spbu.ru)