

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Паршиной Елены Анатольевны

«Роль зиксина, белка фокальной адгезии, в регуляции уровня транскриптов генов-маркеров стволовых клеток», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Работа Паршиной Елены Анатольевны лежит в русле проблемы механизмов взаимосвязи между морфогенезом и клеточной дифференцировкой и посвящена изучению роли LIM-доменного цитоскелетного белка Zyxin в регуляции экспрессии генов плюрипотентности в эмбриональном развитии шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, рыбки *Danio rerio* и в линии клеток человека HEK293. Выяснение механизмов морфогенетических движений и дифференцировки клеток, двух основных процессов эмбриогенеза, является одной из актуальных проблем молекулярной биологии развития. Важная роль в морфогенетических движениях клеток в эмбриогенезе, как известно, принадлежит белкам цитоскелета, в частности, белку Zyxin, который осуществляет контроль сборки актиновых микрофиламентов и формирования межклеточных контактов. Zyxin способен взаимодействовать, и, соответственно, оказывать влияние на активность ряда факторов транскрипции и белков, вовлеченных во внутриклеточную передачу сигналов. В связи с этим, поиск его партнеров и мишеней является перспективным подходом к выяснению механизмов, обеспечивающих согласование между этими процессами в нормальном эмбриональном развитии и при патологиях развития.

Работа написана по традиционной схеме, содержит 122 страницы, 37 рисунков и 5 таблиц. Она состоит из введения, разделов: «Обзор литературных данных», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение» и выводов. Список используемой литературы содержит 144 источника.

Во введении автор обосновывает актуальность темы исследования, на основе изучения научной литературы, формулирует его цель и задачи. Задачи исследования заключались в подтверждении влияния белка Zyxin на экспрессию генов семейства *rou5f3* методом количественного ПЦР-анализа и методом гибридизации *in situ*, доказательстве специфичности этого влияния; определении механизма влияния Zyxin на количество транскриптов *rou5f3*; проверке участия белка Ybx1 в регуляции количества транскриптов генов *rou5f3*; исследовании механизмов увеличения количества транскриптов других генов плюрипотентности (*klf4*, *vent2.1*, *vent2.2*) и анализе функциональной значимости найденного механизма на других модельных объектах.

Обзор литературы, посвящен анализу имеющихся сведений о структуре, известных взаимодействиях, функциях белка Zyxin, факторов плюрипотентности в различных клеточных процессах в эмбриональном развитии. Приведены данные о роли Zyxin, связывающего актиновый цитоскелет со структурами клеточных контактов, в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП). Рассмотрена структура, взаимодействия, роль в клеточных процессах, ЭМП, другого анализируемого в работе регуляторного белка Ybx1 (Y-box binding protein 1), с эволюционно древним доменом холодового шока (Cold

Shock Domain, CSD). ЭМП имеет фундаментальное значение не только для гомеостаза тканей, эмбрионального развития, но также для прогрессии раковых заболеваний, что подчеркивает необходимость понимания механизмов, лежащих в основе пластичности клеток. Приведенные в работе Паршиной Е.А. сведения полезны и интересны не только для специалистов, но и для широкого круга ученых, занимающихся фундаментальной проблемой «клеточной дифференцировки». Содержание обзора тесно связано с темой работы, тема исследования автором раскрыта полностью и свидетельствует о знании автором изучаемой проблемы, умении систематизировать и критически анализировать научные данные. Обзор написан грамотным лаконичным языком, проиллюстрирован схемами из цитируемых работ.

В разделе «Материалы и методы» автор достаточно подробно описывает использованные в работе экспериментальные подходы и методы, для получения результатов, в соответствии с поставленными задачами. Следует отметить широкий спектр применяемых в работе современных методов: блокирование трансляции *Zuxin* путем микроинъекции синтетических антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов, блокирование транскрипции актиномицином D, ПЦР в реальном времени, изготовление репортерных конструкций, трансформация клеток, гибридизация *in situ*, флуоресцентная микроскопия, применение флуоресцентного трейсера FLD, изучение белок-белковых взаимодействий методом ко-иммунопреципитации, электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях в ПААГ, статистический анализ.

Раздел «Результаты» состоит из 6 частей. В работе Паршиной Е.А. получен ряд принципиально важных новых данных. Обнаружено, что при подавлении трансляции белка *Zuxin* наиболее существенные изменения затрагивают экспрессию гена плюрипотентности *rou5f3.3*, количество мРНК которого увеличивается в эмбрионах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Специфичность этого эффекта была подтверждена в опытах по восстановлению нормальной экспрессии белка *Zuxin*. Так же автором показано, что за наблюдаемым увеличением количества мРНК *rou5f3.3* следует увеличение количества соответствующего белка. И выявленные молекулярные эффекты имеют физиологическое значение – нокдаун *zuxin* препятствует дифференцировке клеток так же, как и повышенная экспрессия *rou5f3.3*. Тем не менее, установлено, что увеличение количества транскриптов *rou5f3.3* при подавлении трансляции белка *Zuxin* не является результатом активации промотора *rou5f3.3*. Обнаружено, что при общем подавлении транскрипции сохраняется увеличение транскрипционной активности гена *rou5f3.3*, что, по мнению автора, связано с подавлением деградации мРНК *rou5f3.3* через взаимодействие белка *Zuxin* с белком *Ybx1*. Паршина Е.А. подробно исследовала взаимодействие белков *Ybx1* и *Zuxin* и роль этого взаимодействия в связывании *Ybx1* с мРНК генов семейства *rou5f3*. Полученные результаты позволили выдвинуть предположение о роли *Zuxin* в регуляции уровня мРНК фактора плюрипотентности *rou5f3.3* в нормальном развитии: *Zuxin* связывает *Ybx1*, что препятствует взаимодействию этого белка с мРНК *rou5f3.3*, приводя к ее деградации и дифференцировке клеток. Интересно, что при исследовании механизма увеличения количества транскриптов других генов плюрипотентности (*klf4*, *vent2.1*, *vent2.2*) оказалось, что увеличение количества мРНК этих генов происходит не за счет связывания с *Ybx1*, а вследствие активации их экспрессии белком *rou5f3.3*. Также автор показала, что обнаруженное явление увеличения количества транскриптов генов плюрипотентности при

нокдауне *zuxin* происходит и на других модельных объектах – эмбрионах *Danio rerio* и клетках линии НЕК293.

Результаты, полученные в работе, являются базой для дальнейших исследований молекулярных механизмов взаимной регуляции процессов морфогенеза, а также канцерогенеза, в которых *Zuxin* принимает участие как белок межклеточных контактов, и дифференцировкой тканей, которая напрямую регулируется генами плюрипотентности. Исследования, представленные в настоящей работе, в совокупности с данными, полученными в лаборатории ранее, с использованием ряда независимых методов, позволили обнаружить универсальный механизм координации клеточной подвижности и дифференцировки, в котором белку *Zuxin* принадлежит ключевая роль. Очевидно, что дальнейшее изучение роли *Zuxin*, его белков-партнеров и мишеней, будет представлять большой интерес, как для понимания фундаментальных механизмов координации морфогенеза и дифференцировки клеток, так и с точки зрения возможного приложения результатов исследований в биомедицине.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Можно отметить не вполне удачные обороты речи, орфографические ошибки в тексте.

Имеется несколько моментов, которые требуют пояснения:

- 1) Большинство экспериментов с зародышами проводилось в условиях подавления трансляции *zuxin*. Только на рис. 13 представлены данные экспериментов с повышением уровня экспрессии *zuxin*. Интересно, что при этом количество транскриптов *rou5f3* уменьшалось лишь в два раза, в то время как при нокдауне *zuxin* в опытных образцах количество мРНК увеличивалось на порядок. Чем можно объяснить такой незначительный эффект от повышения уровня экспрессии *zuxin*?
- 2) Предпринимались ли попытки изучить влияние нокдауна *zuxin* на работу эндогенного промотора гена *rou5f3.3*? Это можно было бы сделать, измерив уровень РНК-полимеразы на промоторе в хроматин-иммунопреципитации или несплайсированного транскрипта этого гена. Эксперименты с люциферазным тестом и влиянию актиномицина D подтверждают гипотезу авторов, но не исключают полностью участие зиксина в регуляции транскрипции гена *rou5f3.3*. Возможно, влияние является достаточно слабым.

Указанные замечания ни в коей мере не снижают положительного впечатления о диссертационной работе Паршиной Е.А. Работа представляет собой синтез биологии развития, молекулярной биологии и генной инженерии и является тщательно выполненным исследованием, в общем мировом русле современных исследований. Оценивая работу в целом, следует отметить, что Елена Анатольевна Паршина продемонстрировала уверенное владение темой исследования и современными методами, умение грамотно излагать материал, обобщать и анализировать полученные экспериментальные данные. Используемые в ходе выполнения работы экспериментальные подходы и методы адекватны поставленным задачам, достоверность результатов не вызывает сомнения. Выводы, сделанные на основании полученных результатов, являются чёткими, научно обоснованными и отражают все стороны работы.

Таким образом, диссертационная работа Паршиной Елены Анатольевны «Роль зиксина, белка фокальной адгезии, в регуляции уровня транскриптов генов-маркеров стволовых клеток» 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 диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
профессор РАН,
ведущий научный сотрудник,
заведующий лабораторией регуляции
экспрессии генов в развитии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биологии гена
Российской академии наук.
119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5
Тел. 916 406 2330
yul.biogen@gmail.com

Шидловский Юлий Валерьевич

10 июня 2022г

ПОДПИСЬ Ю.В. Шидловского

ЗАВЕРЯЮ.

М. ДИРЕКТОРА ИБГ РАН

Г.В. Мансурова
МАНСУРОВА Г.В.

