

ОТЗЫВ

официального оппонента Лябина Дмитрия Николаевича на диссертационную работу Паршиной Елены Анатольевны «РОЛЬ ЗИКСИНА, БЕЛКА ФОКАЛЬНОЙ АДГЕЗИИ, В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность диссертационного исследования

Работа Елены Анатольевны Паршиной посвящена изучению роли белка фокальной адгезии Zyxin в регуляции процессов клеточной дифференцировки в эмбриональном развитии шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Дифференцировка клеток и морфогенез являются важнейшими процессами эмбрионального развития. Синхронизация этих процессов необходима для нормального эмбрионального развития, а выяснение механизмов, отвечающих за согласование дифференцировки клеток и морфогенеза являются актуальнейшей задачей молекулярной биологии развития. В связи с этим важен поиск белков, способных координировать морфогенетические движения клеток и регулировать экспрессию факторов плюрипотентности и дифференцировки. Цитоскелетный белок Zyxin, способный регулировать генную экспрессию, – один из немногих известных белков-посредников, обеспечивающих влияние морфогенеза на клеточную дифференцировку. И хотя основная молекулярная функция Zyxin состоит в контроле сборки актиновых филаментов, Zyxin может перемещаться в ядро при определенных условиях и модулировать экспрессию генов. Таким образом, Zyxin можно рассматривать связующее звено между актин-зависимыми морфогенетическими движениями клеток и транскрипцией генов в ядре. Поэтому первостепенная цель диссертационной работы Е.А. Паршиной состояла в изучении возможных функции Zyxin в регуляции экспрессии генов во время эмбриогенеза, когда связь морфогенетических движений с экспрессией генов проявляется наиболее сильно.

Кроме того, нарушение функций Zyxin может способствовать развитию злокачественных новообразований, в связи с чем исследование его роли в регуляции дифференцировки клеток может иметь важное значение для медицины.

Таким образом, тема диссертационной работы Е.А. Паршиной «Роль зиксина, белка фокальной адгезии, в регуляции уровня транскриптов генов-регуляторов стволовых клеток» обладает несомненной актуальностью не только для фундаментальной науки, но и, в перспективе, для медицины, ветеринарии и сельского хозяйства.

Структура работы

Материал диссертации изложен на 122 страницах машинописного текста, включает в себя 37 рисунков. Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями к оформлению работ и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературных данных», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы», который содержит 144 ссылки.

Научная новизна и практическая значимость работы

В диссертационной работе Елены Анатольевны Паршиной впервые показано, что цитоскелетный белок Zyxin регулирует уровень мРНК генов *rou5f3*, *klf4* и *vent2.1/2* в стволовых клетках эмбрионов *Xenopus laevis*, а также уровень мРНК *NANOG*, *POU5F1/OCT4* и *KLF4* в человеческих клетках HEK293 и эмбрионах *Danio rerio*. Также впервые было показано, что Zyxin уменьшает концентрацию мРНК генов семейства *rou5f3* за счет образования комплекса с мРНК-связывающим белком YB-1, который, находясь вне этого комплекса, стабилизирует мРНК *rou5f3*. На основании полученных данных была предложена модель регуляции стабильности мРНК *rou5f3* с помощью Zyxin в эмбриональном развитии *Xenopus laevis*.

Таким образом, диссертационное исследование Е.А. Паршиной позволило обнаружить новый механизм регуляции плюрипотентности эмбриональных клеток, связанный с белком Zyxin – негативным регулятором активности генов плюрипотентности *rou5f3*, *POU5F1*, *Klf4*, *NANOG*.

Полученные результаты могут быть применены для разработки терапии и диагностики онкозаболеваний человека, основанных на использовании белков Zyxin и YB-1.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Положения, сформулированные в диссертации Елены Анатольевны Паршиной, основаны на большом объеме фактического материала. Выводы полностью обоснованы совокупностью приведенных данных, статистическая

обработка экспериментальных данных адекватна, их достоверность не вызывает сомнений.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Диссертационная работа Е.А. Паршиной по структуре изложения материала соответствует стандартам. Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы, обосновывает ее актуальность, теоретическую и практическую значимость. Обзор литературы разделен на 3 части, которые посвящены главному объекту исследования - белку Zuxin, явлению плюрипотентности и транскрипционным факторам плюрипотентности, регулирующим эмбриональное развитие *Xenopus laevis*, а также белку YB-1 и его роли в эмбриогенезе. Немаловажно, что иллюстративный материал главы «Обзор литературы» в значительной степени способствует пониманию описываемого материала..

Раздел «Материалы и методы» содержит 16 подразделов и соответствует поставленным экспериментальным задачам. Практически все экспериментальные процедуры и условия описаны достаточно подробно, что позволит при необходимости их воспроизвести. Особенно следует отметить приведенные в этом разделе таблицы состава буферов и растворов, использованных в работе.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор представляет полученные данные и сопровождает их весьма развернутым и доходчивым обсуждением. Необходимо отметить высокое экспериментальное мастерство, проявленное автором при выполнении диссертационной работы. В разделе «Обсуждение» диссертант весьма кратко, но достаточно анализирует полученную информацию и подводит итоги исследования. Раздел «Выводы» содержит 6 утверждений, выносимых на защиту, все из которых не вызывают серьезных нареканий.

Ошибки и опечатки в рукописи присутствуют, однако их количество мало, что не мешает ознакомлению с диссертацией.

В целом после прочтения рукописи не остается сомнений в научной значимости и завершенности диссертационной работы, а также в ее потенциальной пользе для будущих фундаментальных и прикладных исследований.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям, материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает

исчерпывающее представление о содержании диссертации и степени участия автора в исследованиях.

Замечания к диссертационной работе

Замечания к разделу «Обзор литературы»

1. Не совсем правильно, на мой взгляд, называть Zuxin транскрипционным фактором (стр.11, начало раздела 2.1.4.). В лучшем случае его можно отнести к ко-транскрипционным факторам.
2. Встречаются жаргонизмы или англицизмы («постериоризовать», межвидовое «гессие», «вортексировали» и т.п.)
3. На рисунке 6 видно, что со стадии 35-36 уровень экспрессии *rou5f3.3* возрастает, но в тексте не объясняется данный факт. Человеку, близко не знакомому с эмбриональным развитием *Xenopus laevis* это не вполне понятно. Кроме того, было бы неплохо в обзоре посвятить отдельную главу эмбриональному развитию *Xenopus laevis*. Это бы очень помогло как пониманию описываемых в обзоре литературы механизмов, так и восприятию некоторых экспериментальных данных.
4. Не вполне правильно говорить о том, что белок SMAUG разрушает материнские мРНК (стр. 22). Скорее он опосредует разрушение нуклеазным комплексом (напр. CCR4/NOT).
5. В отношении описания YB-1 как основного белка мРНКП есть следующее замечание. У *Xenopus* более известен как мажорный компонент мРНКП ооцитов белок FRGY2 (гомолог YB-2 человека), а не FRGY1 (YB-1). Но про него в обзоре не упоминается вовсе. Разумеется, в дальнейшем справедливо описывается YB-1, так как именно этот белок взаимодействует с Zuxin, но отсутствие даже упоминания FRGY2 выглядит странно. К тому же на стр. 25 за сайт связывания YB-1 выдается сайт связывания FRGY2 (YRS-последовательность).
6. Имеется несколько неточностей в главе о белке YB-1. YB-1 был идентифицирован как транскрипционный фактор в 1988 году, а не в 1970-х (как указано на стр. 23). В 1970-х он был открыт как белок мРНКП (но еще не было известно, что это Y-бокс-связывающий белок). Ссылку можно было

привести на оригинальную работу. Последнее также относится к описанию участия YB-1 в ЭМП – ссылка на работу Evdokimova et al., 2009 была бы уместнее.

7. Возможно, самое серьезное замечание к обзору литературы (а именно к главе о YB-1) состоит в том, что в нем отсутствует описание одного важного факта участия YB-1 в эмбриональном развитии. В частности, не упомянута работа Yang et al., 2019 (RNA 5-Methylcytosine Facilitates the Maternal-to-Zygotic Transition by Preventing Maternal mRNA Decay) о роли YB-1 в стабилизации мРНК в эмбриональном развитии *Danio rerio*. А между тем, это имеет непосредственное отношение и к теме диссертации, и к достигнутым результатам. Возможно, данную публикацию нужно было прокомментировать в главе «Обсуждение».

Замечания к разделу «Материалы и методы»

1. По тексту раздела вместо $MgCl_2$ написано $MgCl$
2. Глава 3.2.1. «Манипуляции с эмбрионами *Xenopus laevis* и *Danio rerio*» описана очень скупо – в отношении эмбрионов *Xenopus laevis* только ссылка на публикацию. Это важная часть работы и её полное описание крайне необходимо.

Замечания к разделу «Результаты»

1. На рисунке 11 не отмечена статистическая значимость наблюдаемых изменений экспрессии избранных генов. Кроме того, здесь и далее (рис 14, например) не приводятся данные вестерн-блотов, показывающие снижение количества белка *Zuxin* при нокдауне с помощью MO. На рисунке 11 можно, конечно, видеть, что количество мРНК *zuxin* снижено, но вестерн-блот был бы нагляднее. К тому же, если верить подписи к оси Y, то изменение количество мРНК *zuxin* произошло примерно в 1 раз. Или всё-таки шкала оси Y – логарифмическая?
2. Не вполне удачны рисунки 18 и 28, когда на фоне высокой экспрессии репортерного гена в ооцитах, его экспрессия после начала развития эмбриона практически незаметна, а о разнице в экспрессии при нокдауне *zuxin* судить трудно.
3. Данные, приведенные на рисунке 19, на мой взгляд, не исключают вклада транскрипции в увеличение количества мРНК *rou5f3* при нокдауне *zuxin*, так как если сравнивать столбцы 2 и 4 для каждой мРНК (без добавления и с добавлением актиномина D), то можно видеть падение относительного уровня

экспрессии мРНК *rou5f3*. Конечно, не указана статистическая значимость наблюдаемых отличий и поэтому трудно судить о достоверности этого предположения. Тем не менее данный факт нуждается в комментарии. Оверэкспрессия YB-1 также повышает уровень мРНК *rou5f3*, что также может быть связано с повышением транскрипции соответствующих генов. Изучение активности промотора *rou5f3.3* говорит об отсутствии такого эффекта (рис. 28), однако эксперимент с актиномицином D не был проведен и однозначно утверждать об отсутствии эффекта YB-1 на транскрипцию *rou5f3* не стоит. К тому же влияние YB-1 на транскрипцию *rou5f3* выглядит логично с точки зрения его распределения между ядром и цитоплазмой под влиянием Zyxin (в присутствии Zyxin YB-1 локализуется в цитоплазме и не активирует транскрипцию *rou5f3* в ядре, при нокадауне *zyxin* YB-1 локализуется в ядре и способен активировать транскрипцию).

4. В опытах по анализу распределения YB-1 и Zyxin (рис. 24) и их взаимодействия использовали инъекцию эмбрионов мРНК *btmc-ybx1*. Какие трудности возникали при проверке такого распределения для эндогенного YB-1? Кроме того, при чтении главы «Результаты» возникали такие вопросы: как экспрессируется ген YB-1 в процессе эмбрионального развития *Xenopus laevis*; изменяется ли количество YB-1 при нокадауне *zyxin*?

5. В опытах с лептомицином B, вероятно, нужен контроль на локализацию белков YB-1 и Zyxin, то есть доказательство предположения автора о влиянии ядерно-цитоплазматического распределения Zyxin на такое распределение YB-1.

6. К вопросу о «маловероятности» вклада Ybx1 в увеличение количества транскриптов *vent2.1* и *vent2.2* при нокадауне *zyxin*. Вероятно, имеется в виду: маловероятно, что это происходит за счет регуляции стабильности указанных мРНК и их связывания с YB-1, но по вопросу регуляции транскрипции соответствующих генов сказать такое трудно, так как не было проанализировано изменение уровня транскриптов *vent2.1* и *vent2.2* и др. при оверэкспрессии YB-1, например.

7. Судя по рисунку 32, уровень мРНК *zyxin* падает при оверэкспрессии *rou5f3.3*, что предполагает регуляторный механизм с обратной связью: чем больше экспрессия *rou5f3.3*, тем меньше уровень *zyxin* – тем больше уровень *rou5f3.3*. Это практически никак не обсуждается в работе.

8. Не вполне понятно описание результатов, представленных на рисунке 33. Есть фраза «Как и в случае с *rou5f3 Xenopus*, на протяжении всей гаструляции до стадии хвостовой почки (10-10,3 hpf) наблюдалось явное увеличение концентраций транскриптов *nanog*», но на рисунке 33 справа представлены данные только для зародышей на стадии хвостовой почки. Было бы крайне любопытно сравнить изменение экспрессии *nanog* при нокадауне *zyxin* на тех же стадиях, что приведены в случае нормального развития зародыша.

Замечания к разделу «Обсуждение»

1. В пункт (1) «доказательств, подтверждающих описанный механизм», вероятно, закралась досадная ошибка. Вместо «снижению» нужно писать «повышению».

Замечания к разделу «Выводы»

1. Более правильно, на мой взгляд писать «синтез белка» или «биосинтез белка», а не «трансляция белка» (пункты 1 и 2).

2. В пункте 3, возможно, не хватает выражения «при подавлении экспрессии *zyxin*». Либо автор имеет в виду увеличение количества транскриптов *rou5f3.3* в эксперименте с контрольными МО, но на рисунке 19 не указана статистическая значимость данного увеличения и в тексте диссертации это не особо обсуждается.

Такое обилие вопросов к диссертационной работе Е.А. Паршиной ни в коем случае не умаляет её научную значимость, поскольку все замечания скорее относятся к некоторым техническим моментам, либо к дополнительным выводам и гипотезам.

Заключение

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Паршиной Елены Анатольевны 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 сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на межлабораторном семинаре группы регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук (Протокол №1 от 7 июня).

Старший научный сотрудник
группы регуляции биосинтеза
белка Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт белка
Российской академии наук
кандидат биологических наук
7 июня 2022 г.

Лябин Дмитрий Николаевич

Тел. 8(916)8292401,

lyabin@vega.protres.ru

Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 4, 142290

Подпись к.б.н. Лябина Д.Н.

заверяю

Ученый секретарь Института белка РАН



к.б.н. Е.Ю. Никонова