

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Байрамова Андрея Вячеславовича** на тему  
**«Генетические основы эволюции плана строения и появления новых структур у  
позвоночных»,**

представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по  
специальности 1.5.3 - молекулярная биология.

Одним из важнейших свойств любой научной дисциплины является способность проникать в прошлое и описывать события, случившиеся много лет назад (а зачастую и много тысяч, миллионов и даже миллиардов лет), и биология в этом плане не исключение. До самых недавних пор в биологическом арсенале «путешествий во времени», фактически, имелись только палеонтологические подходы (с помощью которых, тем не менее, было получено очень много ценной информации). Однако в XXI веке, с развитием технологий генетического (в том числе филогенетического) анализа и высокопроизводительного секвенирования, биология сделала огромный шаг вперед (точнее, назад, если ориентироваться по временной шкале): стало возможным выявлять молекулярно-генетические механизмы, важные для эволюции, и сравнивать их друг с другом у разных групп организмов. Такое сравнение часто позволяет заключить, в какой именно группе живых существ впервые появился тот или иной механизм в ходе становления жизни на нашей планете. Подобного рода работы крайне важны в фундаментальном смысле, поскольку позволяют нам лучше понять эволюцию – процесс, лежащий в основе возникновения и развития на Земле жизни, а значит, и человеческой цивилизации.

Диссертационная работа Андрея Вячеславовича Байрамова, посвященная исследованию нескольких семейств регуляторных генов, участвующих в формировании плана строения эмбрионов позвоночных, представляет собой яркий пример подобного рода исследований. В работе использован идеологический подход, который, честно признаться, привел меня в полное восхищение. Позволю себе процитировать автора: «Идея настоящей работы состоит в том, что для исследования механизмов появления новых структур и признаков лучше всего подходят представители филогенетических групп, у которых эти признаки появляются впервые в эволюции». Собственно говоря, данное утверждение является бесспорным, но Андрей Вячеславович, высказав его, пошел гораздо дальше. Автором был определен круг интересных с научной точки зрения признаков (в основном, это формирование у животных конечного мозга и парных конечностей), выявлены по литературным данным предковые формы животных, у которых эти признаки появились впервые и проведена работа с использованием современных представителей соответствующих древних эволюционных линий. Проще говоря, основными объектами работы Андрея Вячеславовича стали миноги, акулы и осетровые рыбы! Именно этот факт и вызвал у меня то самое восхищение, о котором я упоминал выше. Все вышеперечисленные животные ни в какой мере не являются модельными лабораторными объектами. Это означает, что Андрею Вячеславовичу и его коллегам фактически пришлось в большой степени самостоятельно разрабатывать методологический арсенал своих исследований, и я даже боюсь представить себе, сколько времени и сил это у них отняло. Тем не менее, они блестяще справились с поставленными задачами и получили множество интереснейших результатов. Я абсолютно уверен, что таким образом наука наградила Андрея Вячеславовича за смелость и самоотверженность, проявленные при выборе для своей работы вышеприведенного набора немодельных, крайне сложных в лабораторном смысле объектов.

Выразив выше эмоции, овладевшие мной после прочтения работы, я готов перейти к ее непосредственному анализу. Работа Андрея Вячеславовича изложена на 382 страницах печатного текста и содержит 127 рисунков и 6 таблиц. Количество ссылок на использованные литературные источники я назвать не готов, поскольку список цитируемой



литературы в работе не пронумерован, однако этот самый список занимает 25 страниц и выглядит весьма внушительно (в том числе, он содержит и работы самых последних лет в большом количестве). Работа построена по стандартному плану и содержит все разделы, необходимые в диссертациях на соискание ученой степени доктора наук. Ниже я попытаюсь дать краткий анализ каждого сутевого раздела в отдельности.

Открывает работу раздел «Введение». Мне очень понравилось, как написан этот раздел. Собственно говоря, в нем изложена уже описанная мной выше концепция о необходимости работы с немодельными объектами для решения задач работы. Это изложение сделано кратко, но емко, в результате чего после прочтения введения становится совершенно ясно, о чем будет работа и почему она будет именно об этом. Таким образом, раздел отлично выполняет свою функцию, то есть вводит читателя в курс дела.

Далее в работе следует обзор литературы. Должен признаться, что ранее я никогда не получал такого удовольствия от чтения обзорных научных текстов. В каком-то смысле для меня обзор литературы, сделанный Андреем Вячеславовичем, по степени увлекательности был очень близок к хорошим образчикам художественной литературы, поскольку в нем идет речь о невероятно интересных вещах, о которых я раньше практически ничего не знал. Раздел начинается с подробного описания миног, хрящевых рыб и осетрообразных как не модельных, но очень перспективных для молекулярных исследований эволюции объектах. Как человеку, отродясь не работавшему ни с чем, кроме клеток человека и дрожжей, мне было очень интересно узнать о таких необычных объектах. После этого Андрей Вячеславович переходит к описанию геномных дупликаций как важнейшей предпосылки эволюционного успеха позвоночных, а затем – к обзору сведений об «идеологических» объектах своего интереса, а именно о конечном мозге, парных конечностях, эмбриональных сигнальных каскадах и процессах регенерации у позвоночных. Раздел написан очень понятно и в то же время подробно. В результате после его прочтения не остается никаких сомнений в том, что Андрей Вячеславович блестяще ориентируется в проблематике работы и способен донести все важные положения этой проблематики до читателя.

Далее в работе следует раздел «Результаты» - безусловно, центральный ее раздел. Ознакомившись с ним, я могу утверждать, что Андрею Вячеславовичу, при помощи коллег, вне всякого сомнения удалось реализовать основную идею своей работы: «приспособить» совершенно неожиданные объекты – эмбрионы миног, акул и осетровых рыб – для сложных лабораторных манипуляций, в число которых входят культивирование эмбрионов, гибридизация *in situ* и некоторые другие. В результате были получены абсолютно новые, значимые научные результаты, которые подробно изложены в диссертации и которые я ниже попытаюсь кратко суммировать.

Первым объектом интереса Андрея Вячеславовича были гены семейства *noggin*. Ген *noggin* был описан в качестве одного из ключевых эмбриональных индукторов еще в 90е годы, однако долгое время исследовался только один ген этого семейства. В диссертационной работе Андрея Вячеславовича при помощи сравнительного филогенетического анализа было установлено, что у позвоночных есть целое семейство генов *noggin*, которое сформировалось в результате как минимум двух раундов полногеномных дупликаций, произошедших в моменты времени, довольно далеко отстоящие друг от друга. Исследование экспрессии генов *noggin* у миног позволило установить, что каждый из четырех генов этого семейства обладает уникальными особенностями экспрессии в туловищных и головных структурах, а экспрессия трех из них в эмбрионах ксенопуса индуцирует формирование полных вторичных осей тела. Два гена семейства *noggin* серой кошачьей акулы экспрессируются аналогично своим ортологам у костистых рыб и амфибий. При этом оказалось, что у акул исчез «классический» ген *noggin1*, что является уникальной ситуацией для позвоночных. Экспрессия гена *noggin2* акулы в эмбрионах ксенопуса индуцирует формирование полных вторичных осей тела, подобно его ортологам у других позвоночных. Что касается генов *noggin* миног, то инъекции мРНК трех из четырех соответствующих генов в эмбрионы лягушки приводят к



формированию вторичных осей тела, а при инъекциях мРНК в эмбрионы миног формирования дополнительных осей не происходило ни в одном из случаев.

После этого Андрей Вячеславович, видимо, почувствовав относительную легкость работы с модельными объектами, вплотную занялся шпорцевой лягушкой *X. laevis*, у которой Андреем Вячеславовичем с коллегами были идентифицированы два ранее неизвестных гена семейства *noggin*, которые были названы *noggin2* и *noggin4*. Были исследованы паттерны их экспрессии в эмбрионах ксенопуса: оказалось, что *noggin2* экспрессируется практически аналогично ранее описанному гену *noggin1*, а *noggin4* – скорее, напротив, комплементарно ему. Экспрессия гена *noggin2*, в отличие от *noggin4*, индуцирует формирование полных вторичных осей у ксенопуса. Также было показано участие *noggin2* в процессах дифференцировки у эмбрионов ксенопуса, аналогичное таковому для *noggin1*. Было установлено участие двух соответствующих белков в регуляции активности внутриклеточных сигнальных каскадов; при этом оказалось, что белок *noggin2* ингибирует активинВ, и это ингибирование критически важно для развития переднего мозга. *Noggin4* при этом не индуцирует формирования дополнительных осей, но участвует в развитии головных структур посредством связывания белка Wnt8 и подавления сигнального каскада Wnt. Крайне интересным видится результат, согласно которому *noggin4* все же способен индуцировать формирование полных вторичных осей тела при его совместном действии с белком tBR, ингибитором двух других внутриклеточных сигнальных каскадов. Это подтверждает данные о том, что для нормального формирования оси тела необходимо ингибировать три каскада. Наконец, в работе была исследована роль белков семейства *noggin* в процессах регенерации у ксенопуса. Оказалось, что экспрессия *noggin4* активируется сразу после ампутации и оказывает стимулирующее влияние на регенерацию конечностей, причем (в случае инъекции эндогенной мРНК) даже на таких стадиях, на которых в норме способность к регенерации утрачивается.

После этого Андрей Вячеславович обратил свое внимание на гены *foxl1*, продукты экспрессии которых описаны в качестве регуляторами развития переднего мозга у позвоночных. В результате проведенного анализа филогении и локальной геномной синтении выяснилось, что у эволюционно древних групп позвоночных имеется по три группы паралогов этого гена, что опять же указывает на два последовательных события полногеномной дупликации на ранних этапах эволюции позвоночных. Анализ экспрессии генов *foxl1* в эмбрионах миноги показал, что все три гена экспрессируются в конечном мозге, хотя и в разных его участках. При этом в эмбрионах стерляди такой профиль экспрессии характерен только для гена *foxl1a*, в то время как два других гена в конечном мозге не экспрессируются.

Еще одним объектом в работе стали гены семейства *Anf*, открытого ранее в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН. В ходе предыдущих работ была выдвинута гипотеза о принципиальной роли появления гена *anf* у предковых позвоночных в возникновении у них конечного мозга, однако гены *anf* не были обнаружены у миног, у которых конечный мозг присутствует. Андрей Вячеславович сумел идентифицировать данный ген у трех видов миног и показать, что он действительно экспрессируется (что было технически крайне сложно сделать). Также был описан пространственный паттерн его экспрессии в эмбрионах. Помимо этого, Андрей Вячеславович показал, что у миног, как и у высших позвоночных, белок Anf подавляет экспрессию гена *otx2* и, напротив, усиливает экспрессию одного из генов *foxl1*, что прямо указывает на его вовлеченность в формирование конечного мозга и подтверждает выдвинутую ранее гипотезу о вкладе *anf* в появление конечного мозга у предковых позвоночных.

Однако на этом Андрей Вячеславович, как говорится, не успокоился и занялся еще одним семейством генов, а именно *chordin-like*. Эти гены являются родственными гену *chordin*, участвующему в осевой дифференцировке эмбрионов. И, если ген *chordin-like2*, согласно анализу филогении и синтении, является эволюционно древним геном, встречающимся у разных представителей двустороннесимметричных животных, то ген *chordin-like1* оказался уникальным для челюстноротых. В работе был проанализирован пространственный профиль их экспрессии в эмбрионах серой кошачьей акулы, стерляди и



лягушки и показана ранняя экспрессия *chordin-like1* в плавниках акул и осетровых. С учетом того что плавники этих групп рассматриваются в качестве базовой модели конечностей позвоночных, предполагается, что *chordin-like1* мог быть связан с появлением этих уникальных структур у предковых челюстноротых. В экспериментах с эмбрионами шпорцевой лягушки была показана способность белка *chordin-like1* связываться с компонентами трех сигнальных каскадов, участвующих в эмбриональном развитии, и ингибировать активность последних. В целом, *chordin-like1* лягушки очевидно принимает участие в развитии эмбрионов, но из данных Андрея Вячеславовича однозначно следует, что его функциональная активность отличается от описанного ранее белка *chordin*. Интересным фактом является и описанное в работе отсутствие у миног гена *chordin*, что является уникальной ситуацией для позвоночных. Имеющийся у миног ген *chordin-like2* экспрессируется на поздних стадиях развития, тогда как ген *chordin* у позвоночных начинает экспрессироваться именно на этих стадиях. Этот факт, наряду с другими представленными в работе данными, свидетельствует об особенностях ранней эмбриональной индукции у миног.

Восторг – вот краткое описание тех чувств, которые я испытал после прочтения раздела «Результаты». Конечно же, здесь сыграл роль и тот факт, что тематика работы Андрея Вячеславовича очень далека от тех направлений биологии, с которыми мне приходится сталкиваться в повседневных научных трудах, а это *a priori* усиливает положительный эффект от ознакомления с работой. Однако же я абсолютно уверен, что результаты Андрея Вячеславовича являются выдающимися не только субъективно, но и объективно. Не могу не повторить еще раз, что работа велась в каком-то смысле на непаханой целине и потребовала разработки с нуля экспериментальных подходов к анализу эмбрионального развития абсолютно нетипичных объектов. Лично я считаю, что это в работе в полной мере удалось. Все результаты, изложенные в данном разделе, крайне интересны с научной точки зрения и, на мой взгляд, являются абсолютно достоверными, поскольку было поставлено множество контрольных экспериментов и биологических и технических повторностей опытов.

После раздела «Результаты» в работе следует раздел «Обсуждение результатов», занимающий ни много ни мало 30 страниц текста. Этот раздел мне тоже очень понравился, и я считаю правильным вынесение Андреем Вячеславовичем дискуссионной части в отдельный раздел. Дело в том, что основные усилия Андрея Вячеславовича при выполнении работы были направлены на восстановление эволюционных событий, случившихся бог знает сколько лет назад и приведших к формированию у позвоночных некоторых уникальных структур. В силу очевидных причин эти события никак невозможно проконтролировать экспериментально, их можно только попытаться восстановить при помощи логических умозаключений, опирающихся на результаты экспериментов. Именно этим и занимается Андрей Вячеславович при обсуждении полученных в работе результатов, причем делает это в том числе и с использованием экспериментальных данных, полученных другими авторами, что позволяет ему делать более основанные предположения. В основном эти предположения касаются вероятных сценариев эволюционного возникновения у позвоночных семейств генов, которые экспериментально изучены в работе. Должен признать, что все его сценарии выглядят весьма логичными и обоснованными. Следовательно, обсуждение результатов Андрею Вячеславовичу также вполне удалось.

Выводы, идущие в работе следом, я считаю полностью обоснованными и непосредственно следующими из полученных Андреем Вячеславовичем экспериментальных результатов.

Следуя традиционной структуре статей в топовых научных журналах, последним сутевой частью работы Андрей Вячеславович сделал методологический раздел. Обычно авторов принято хвалить за широкий методологический арсенал работы; здесь же я этого сделать не могу, поскольку Андрей Вячеславович использовал достаточно ограниченный набор методов (я насчитал шесть штук, не включая филогенетический анализ *in silico*). Однако же и ругать Андрея Вячеславовича здесь совершенно не за что. Во-первых, все



поставленные задачи были успешно решены в работе этим набором методов, а во-вторых, истинное чудо, что удалось применить эти методы в работе с настолько нетривиальными объектами. Описание методов дается Андреем Вячеславовичем с идеальным соблюдением баланса между необходимостью описания методик таким образом, чтобы эксперименты автора можно было воспроизвести по данным описаниям, и нежелательностью излишне подробного изложения стандартных процедур.

Напоследок немного попеняю Андрею Вячеславовичу за раздел «Список сокращений» - он категорически неполон, многих нестандартных сокращений, используемых в работе, там нет, что несколько затрудняет чтение работы.

Безусловно, после прочтения такого объемного труда у меня не могло не возникнуть некоторых замечаний и вопросов к Андрею Вячеславовичу, каковые я и излагаю ниже.

1. Общее замечание к рисункам раздела «Результаты». Чаще всего это рисунки, еле помещающиеся на страницу, со множеством панелей. Далеко не всегда к рисункам имеются детальные подписи, расшифровывающие, что именно на каких панелях изображено. Помимо этого, нередки ситуации, когда такой многопанельный рисунок помещен в работе сразу после текстового описания первой его панели. В таких ситуациях описание его последних панелей может произойти через 5-10 страниц после собственно рисунка. Такая конфигурация работы несколько усложняет чтение.

2. Стр. 118, рисунок 25 – на гистограммах не указано стандартное отклонение, и таким образом неясно, имели ли место повторы эксперимента. Кроме того, вызывает вопросы ситуация на двух панелях рисунка, посвященных анализу экспрессии генов *pogginB* и *pogginD*, когда экспрессия этих генов сначала резко падает, а затем возрастает в эмбриональном развитии. Более того, судя по гистограмме для гена *pogginD*, его максимальная экспрессия наблюдается на стадии 9, а на всех последующих стадиях снижена примерно в два раза. В то же время, на стр. 122 автор утверждает, что экспрессия гена *poggin* начинается со стадии 17, в то время как на гистограмме явно видна более ранняя экспрессия. Этот момент в работе мне остался неясен.

3. Стр. 125-127, рис. 28. Текст и рисунок посвящен микроинъекциям мРНК, кодирующих гены *Noggin* миноги, в эмбрионы ксенопуса. Судя по всему, использовались люциферазные репортерные конструкции, однако ни в тексте, ни в подписи к рисунку об этом не сказано. Если это действительно так, то существуют ли данные по стабильности таких мРНК в эмбрионах ксенопуса? Проводились ли эксперименты по дозозависимости эффекта этих мРНК в отношении формирования дополнительных осей тела?

4. Стр. 138-139. В начале раздела 2.1.2.2 Андрей Вячеславович ставит вопрос о том, насколько ген *poggin2* серой акулы может пространственно компенсировать отсутствие гена *poggin1*. Честно говоря, ответа на этот вопрос в данном разделе я не уловил.

5. Стр. 139 и 142. В тексте отмечается, что наблюдаемые паттерны экспрессии генов *poggin2* и *poggin4* могут вызвать вопросы относительно специфичности наблюдаемых сигналов. В связи с этим, был поставлен дополнительный контрольный эксперимент, который подтвердил специфичность. Честно говоря, я не вполне понял, почему именно эти паттерны экспрессии могли вызвать какие-то вопросы. С другой стороны, сам по себе контрольный эксперимент (гибридизация *in situ* со смысловыми зондами вместо антисмысловых) представляется мне очень удачным, и мне кажется, что правильно было бы ставить его во всех случаях, когда использовалась гибридизация *in situ*.

6. Стр. 150, рис. 42А. В результатах ОТ-ПЦР, на мой вкус, не хватает гистограммы с количественным расчетом уровня экспрессии генов *poggin*.

7. Стр. 172 – Андрей Вячеславович констатирует неспособность белков *poggin* ингибировать некоторые сигнальные каскады в случае их дополнительной внутриклеточной активации. По мнению автора, это является дополнительным подтверждением внеклеточного характера активности белков *poggin*. Во-первых, как мне кажется, это также может отражать высокую силу активации, для «противодействия» которой экспериментальных концентраций белков *poggin* не хватает. Во-вторых, возникает



вопрос о том, была ли ранее продемонстрирована локализация активности белков *noggin*, и если была, то нуждается ли она в дополнительном подтверждении.

8. Стр. 179 – автор описывает очередной эксперимент по использованию трансляции эндогенных мРНК *noggin4* морфолиновыми олигонуклеотидами и приводит данные по подтверждению специфичности эффекта при помощи контрольного эксперимента по «спасению», в котором проводилась дополнительная инъекция мРНК *noggin*, не способная связываться с морфолиновыми олигонуклеотидами. Возникает вопрос, почему подобные контрольные эксперименты, действительно подтверждающие наблюдаемые эффекты, не ставились в аналогичных опытах с морфолиновыми олигонуклеотидами, которые автор описывал ранее по тексту.

9. Стр. 185 и 190 – Андрей Вячеславович описывает анализ влияния уровня экспрессии гена *noggin4* на активность катенинового сигнального каскада методом ОТ-ПЦР и эксперимент по конкурентному вытеснению *Noggin4* из комплекса с *Wnt8*. Осталось не вполне ясным, почему ни тот, ни другой эксперименты не проводились в аналогичных исследованиях генов *noggin1* и *noggin2*.

10. Подраздел 2.5 раздела «Результаты» во многом посвящен генам семейства *Noggin* и, на мой вкус, гораздо органичнее бы смотрелся сразу после подраздела 2.1, в котором всесторонне исследуются эти гены.

11. Стр. 290 – здесь Андрей Вячеславович впервые в работе указывает на возможный вклад стабильности инъецируемых мРНК в получаемые в соответствующих экспериментах результаты. Честно говоря, даже несмотря на то, что практически во всех экспериментах, описанных автором ранее, при помощи инъецируемых мРНК достигался некий экспериментальный эффект, я бы все равно предпочел видеть в каждом из таких случаев контроль на стабильность мРНК (тем более что его достаточно легко поставить при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени). Однако именно здесь, когда Андрей Вячеславович не увидел никакого эффекта от инъекций мРНК различных генов в отношении формирования дополнительных осей у миног, этот контроль действительно максимально уместен, и Андрей Вячеславович поставил соответствующий эксперимент, однако почему-то взял для этих целей не те мРНК, которые участвовали в эксперименте, а совсем другие, и оценивал количество белкового продукта этих мРНК в разные моменты времени после инъекции. Мне кажется, что более правильным контролем служила бы количественная оценка именно экспериментальных мРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Полагаю, нет нужды отдельно отмечать (и, тем не менее, отмечу), что все вышеуказанные замечания не являются принципиальными, не снижают научной ценности работы Андрея Вячеславовича и ни в коей мере не ослабляют того восторга, который я испытывал при прочтении работы.

Принципиальный вклад Андрея Вячеславовича в представленную работу подтверждается его ключевой ролью в публикациях в ведущих рецензируемых журналах, в которых подробно отражено содержание диссертации и в большинстве которых Андрей Вячеславович выступает в роли первого автора или автора для переписки.

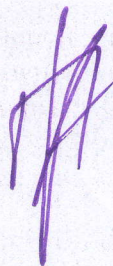
Завершая анализ работы Андрея Вячеславовича, скажу еще раз, что она произвела на меня сильное положительное впечатление и, несомненно, является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методологическом уровне и имеющей большое научное и практическое значение. Содержания диссертационной работы в полной мере соответствует специальности 1.5.3 - молекулярная биология. Изучаемые проблемы являются актуальными, все полученные результаты обладают научной новизной, выводы из работы полностью обоснованы.

Таким образом, диссертационная работа Андрея Вячеславовича Байрамова на тему «Генетические основы эволюции плана строения и появления новых структур у позвоночных», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология по своей актуальности, научной новизне, полноте описания и достоверности полученных результатов соответствует всем 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; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539; 29.09.2022 г. № 1690) и предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Байрамов Андрей Вячеславович, вне всякого сомнения, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Профессор кафедры молекулярной биологии  
биологического факультета ФГБОУ ВО  
«Московский государственный университет  
имени М.В.Ломоносова», д.б.н.



Каменский Петр Андреевич

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
Тел. +7 (495) 939-54-85  
E-mail: peter@protein.bio.msu.ru

Подпись д.б.н. Каменского П.А. удостоверяю.

Заместитель декана биологического  
факультета ФГБОУ ВО «Московский  
государственный университет имени  
М.В.Ломоносова»

23.09.2024



Рубцов Александр Михайлович