

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,  
по диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 14 февраля 2024 г. № 2

О присуждении **Орлову Евгению Евгеньевичу** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Секретируемая металлопротеиназа Mmp3 как регулятор скейлинга системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология принята к защите 6 декабря 2023 г. (протокол заседания №30) Диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Орлов Евгений Евгеньевич родился в Москве 04 декабря 1989 года. В 2013 г. окончил специалитет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по специальности «Физиология», специализация Эмбриология. С 2013 по 2017 гг. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности научного сотрудника в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН.

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор Зарайский Андрей Георгиевич, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты - Краус Юлия Александровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Кафедры биологической эволюции биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения

высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» и Адамейко Игорь Игоревич, доктор биологических наук, профессор, руководитель Лаборатории нейроиммунологии Центра изучения мозга Венского медицинского университета дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, в своем **положительном** отзыве, составленном доцентом кафедры эмбриологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, к.б.н. Костюченко Романом Петровичем, и утвержденном проректором по научной работе ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет к.ф.-м.н. Микушевым Сергеем Владимировичем, указала, что диссертация Орлова Евгения Евгеньевича «Секретируемая металлопротеиназа Mmp3 как регулятор скейлинга системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*» соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (в ред. Постановлений Правительства от: 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 №650, 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 20.03.2021 № 426, 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 10 опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 10 работ общим объемом 2,6 печ. л. в рецензируемых научных изданиях из перечня, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Е.Е. Орлов внес основной либо существенный вклад, включают:

1. **Orlov, E. E.**, Nesterenko, A. M., Korotkova, D. D., Parshina, E. A., Martynova, N. Y., Zaisky, A. G. Targeted search for scaling genes reveals matrix metalloproteinase 3 as a scaler of the dorsal-ventral pattern in *Xenopus laevis* embryos. // *Developmental cell*. 2022. T. 57. № 1. С. 95–111.e12.
2. Parshina, E. A., **Orlov, E. E.**, Zaisky, A. G., Martynova, N. Y. The Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits Retinoic Acid Signaling by Destabilizing the Maternal mRNA of the RXR $\gamma$  Nuclear Receptor. // *International journal of molecular sciences*. 2022. T. 23. № 10. С. 5627.
3. Parshina, E. A., Eroshkin, F. M., **Orlov, E. E.**, Gyoeva, F. K., Shokhina, A. G., Staroverov, D. B., Belousov, V. V., Zhigalova, N. A., Prokhortchouk, E. B., Zaisky, A. G., Martynova, N. Y. // Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits the Activity of Genes Responsible for Embryonic Stem Cell Status. *Cell reports*. 2020. T. 33. № 7. С. 108396.
4. Tereshina, M. B., Ivanova, A. S., Eroshkin, F. M., Korotkova, D. D., Nesterenko, A. M., Bayramov, A. V., Solovieva, E. A., Parshina, E. A., **Orlov, E. E.**, Martynova, N. Y.,

- Zaraisky, A. G. Agr2-interacting Prod1-like protein Tfp4 from *Xenopus laevis* is necessary for early forebrain and eye development as well as for the tadpole appendage regeneration. // *Genesis*. 2019. Т. 57. № 5. С. e23293.
- Иванова, А. С., Мартынова, Н. Ю., Комаров, П. А., **Орлов, Е. Е.**, Ермакова, Г. В., Зарайский, А. Г., Терёшина, М. Б. Получение Agr2-специфичных антител и определение паттерна распределения белка Agr2 в раннем развитии эмбрионов и регенерации головастиков *Xenopus laevis*. // *Онтогенез*. 2018. Т. 49. № 6. С. 385-390.
  - Орлов, Е. Е.**, Нестеренко, А. М., Мартынова, Н. Ю., Зарайский, А. Г. Визуализация градиента сайтов связывания морфогенов в эмбрионе шпорцевой лягушки с помощью флуоресцентно меченного гепарин-связывающего мотива морфогена BMP4. // *Биоорганическая химия*. 2017. Т. 43. № 3. С. 333-336.
  - Байрамов, А. В., Ерошкин, Ф. М., Мартынова, Н. Ю., **Орлов, Е. Е.**, Бородулин, А. В., Зарайский, А. Г. Секретируемый белок Noggin – активатор Wnt/PCP-сигнального каскада. // *Биоорганическая химия*. 2017. Т. 43, № 2. С. 214-217.
  - Мартынова, Н. Ю., Нестеренко, А. М., **Орлов, Е. Е.**, Ерошкин, Ф. М., Бородулин, А. В., Байрамов, А. В., Зарайский, А. Г. Взаимодействие секретируемых белков Noggin4 и Wnt8 из эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. // *Биоорганическая химия*. 2016. Т. 42. № 3. С. 375.
  - Eroshkin, F. M., Nesterenko, A. M., Borodulin, A. V., Martynova, N. Y., Ermakova, G. V., Gyoeva, F. K., **Orlov, E. E.**, Belogurov, A. A., Lukyanov, K. A., Bayramov, A. V., Zaraisky, A. G. Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus laevis*. // *Scientific reports*. 2016. Т. 6. С. 23049.
  - Nesterenko, A. M., **Orlov, E. E.**, Ermakova, G. V., Ivanov, I. A., Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Martynova, N. Y., Zaraisky, A. G. Affinity of the heparin binding motif of Noggin1 to heparan sulfate and its visualization in the embryonic tissues. // *Biochemical and biophysical research communications*. 2015. Т. 468. № 1-2. С. 331–336.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**1. Отзыв официального оппонента д.б.н., проф. Адамейко Игоря Игоревича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

К незначительным замечаниям в отношении данной работы можно отнести весьма краткую дискуссию о потенциальных ограничениях использования шпорцевой лягушки в качестве модельной системы, а также того, как полученные результаты могут не полностью или полностью экстраполироваться на другие виды, включая человека (и почему). Указанное замечание не снижает ценности диссертации.

**2. Отзыв официального оппонента д.б.н. Краус Юлии Александровны,** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

Основное замечание – недостаточно продуманное изложение материала. В первую очередь, вызывает недоумение излишняя краткость в изложении подраздела «Результатов» 7.1. «Все известные модели скейлинга, основанные на модуляции морфогенетического градиента, имеют элементы со значительной разницей в концентрации». Именно на этом материале строится гипотеза автора, и хотелось бы более подробно узнать о том, как выполнялся анализ моделей скейлинга.

Кроме того, каждый подраздел раздела «Результаты» на самом деле представляет собой локальную комбинацию разделов «Введение», «Результаты» и «Обсуждение», что

сильно затрудняет чтение работы. Иногда довольно сложно отделить информацию, на которую ссылается автор, от его собственных результатов. Таков, например, подраздел 7.5 «Mmp3 расщепляет секретируемые белки Noggin1 и 2 и препятствует деградации Chordin путем разрушения металлопротеазы Tolloid-like1.». Также внутри каждого подраздела сгруппированы результаты, полученные в ходе нескольких экспериментов. Так, в подразделе 7.4. «Нокдаун *mmp3* приводит к уменьшению сомитной мезодермы и нервной пластинки, но одновременно к увеличению нотонорда» речь идет далеко не только об экспериментах по нокдауну *mmp3*, но и об экспериментах по «спасению» эмбрионов, а также по оверэкспрессии *mmp3* и по нокауту *mmp3* с помощью CRISPR-Cas9.

В результате использования такого подхода к изложению материала, работа лишилась полноценных разделов «Обсуждение» и «Заключение». Это вызывает сожаление, так как работа плотно насыщена данными, которые нуждаются в более плотном обсуждении.

В работе часто встречаются неудачные слова, словосочетания и выражения. Часть из них явно «пришла» из лабораторного жаргона, часть просто не отредактирована автором. Это, например, «Восстановление эффектов, вызванных *mmp3*-МО». «Предполагаемая схема формирования зачатка нотохорда белками Chordin и Noggin1/2», целые эмбрионы и «большие эмбрионы» (очевидно, интактные эмбрионы), «половинные эмбрионы» и т.п.

Ряд выводов, особенно первый из них, нуждается в более четкой и краткой формулировке (хотя по сути выводов никаких возражений нет).

**3. Отзыв ведущей организации.** Отзыв положительный, содержит ряд непринципиальных замечаний:

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»). 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 лишь уместно говорить об 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 *mtpr3* 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 неё?

4. Отзыв на автореферат Никишина Дениса Александровича, кандидата биологических наук, старшего научный сотрудник Лаборатории проблем регенерации Института биологии развития РАН. Отзыв положительный. Замечаний нет.

5. Отзыв на автореферат Гурской Надежды Георгиевны, кандидата биологических наук, и.о. заведующего Отделом регенативной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова"

Министерства здравоохранения Российской Федерации. Отзыв положительный. Замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии и биологии развития, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. Работы официального оппонента И.И. Адамейко связаны с применением омиксных технологий в биологии развития и моделированием процессов развития. Работы И.И. Адамейко получили международное признание и опубликованы в таких журналах как Nature и Science. Официальный оппонент Краус Ю.А. является признанным специалистом в области изучения регуляции развития полипа *Nematostella vectensis*. Коллектив кафедры эмбриологии СПбГУ во главе с Р.П. Костюченко, сделавший экспертизу данной работы, также занимается проблемой регуляции у полихет. Таким образом, оппоненты и представители ведущей организации являются высококлассными специалистами в рассматриваемой области, что позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что диссертантом впервые произведено теоретическое обоснование существования в эмбриогенезе скейлеров. Диссертанту впервые удалось обнаружить скейлер экспериментально – матриксную металлопротеазу-3 шпорцевой лягушки. Диссертант впервые описал влияние матриксной металлопротеазы 3 на формирование дорзо-вентральной оси эмбриона и впервые показал механизм влияния матриксной металлопротеазы 3 на BMP-сигнальный каскад при формировании дорзо-вентральной оси. Впервые описаны два новых субстрата для матриксной металлопротеазы 3 – белки *Noggin1/2* и *Tolloid-like1*. Наконец, автором впервые предложена модель дифференцировки мезодермальных зачатков эмбриона с помощью совместного действия морфогенов *Noggin1/2* и *Chordin*. Кроме того, Диссертационный совет отмечает значительный теоретический вклад работы диссертанта в молекулярную биологию: гипотеза о существовании скейлеров в эмбриогенезе была подтверждена, что позволяет производить поиск новых скейлеров в различных модельных системах, значительно обогащая наши знания молекулярных основ эмбриогенеза. Наконец, диссертационный совет обращает внимание на то, что работа диссертанта имеет большое практическое значение: обнаружение двух новых субстратов для фермента матриксной металлопротеазы 3 – белков *Noggin1/2* и *Tolloid-like1* – может помочь в раскрытии механизмов таких патологических процессов человека, как артрит и метастазирование, в которые активно вовлечена матриксная металлопротеаза 3.

Достоверность результатов исследования сомнений не вызывает: исследования проводились с использованием современных научных методов, экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, все эксперименты численно проанализированы с использованием строгих статистических критериев (тест Стьюдента или ANOVA-тест со множественными сравнениями).

Личный вклад соискателя состоит в активном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы. Все эксперименты по получению уменьшенных эмбрионов *Xenopus laevis*, инъекции в эмбрионы *Xenopus laevis*, выделению тотальной РНК для NGS-секвенирования и кОТ-ПЦР, кОТ-ПЦР, иммуногистохимии, вестерн-блоттингу, получению серийных срезов, получению антител, и большинства генетических конструкций проведены лично Орловым Е.Е. Некоторые генетические конструкции, описанные в работе, получены научным сотрудником лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН к.б.н. Паршиной Еленой Анатольевной. Кроме того, Паршиной Е.А. проведены некоторые эксперименты по *in situ* гибридизации. Создание математической модели, *in silico* эксперименты и обработка изображений в программе iLastik проведены научным сотрудником лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН к.ф.-м.н. Нестеренко Алексеем Михайловичем. Концептуализация модели осуществлялась совместными усилиями сотрудников лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН- Зарайского А.Г., Нестеренко А.М., Орлова Е.Е. CrispR/Cas9-нокаут проведен д.б.н. Зарайским А.Г. и к.б.н. Коротковой Дарьей Дмитриевной, младшим научным сотрудником лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН. Кроме того, Орлов Е.Е. принимал участие в подготовке материалов научных публикаций по теме диссертационной работы.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Орлова Е.Е. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят важный вклад в развитие молекулярной биологии и биологии развития. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом диссертационная работа Орлова Евгения Евгеньевича «Секретируемая металлопротеиназа Mmp3 как регулятор скейлинга системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном 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; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. У вас, судя по вашему докладу, сложилась некая концепция как всё это устроено, как всё это действует. Согласно вот этим вашим представлениям, скейлеров должно быть много? Или вы нашли то небольшое, что есть?
2. Два вопроса. Один совсем коротенький, такой образовательный. Скажите, пожалуйста, вот эмбрионы, разделенные на несколько частей, когда они разовьются, у них остается хоть какая-то память, что с ними провели эту операцию? Средний размер этих эмбрионов в сравнении с теми, у которых не было этой операции, -- он хоть сколько-то отличается?
3. Что-нибудь об белке вы можете сказать? Вы это совершенно не затрагивали. Что за белок, размеры, организация, структура, домены, какие-то может быть еще активности. Вот есть какая-то информация? У вас или в литературе.
4. Насколько я понимаю, вы в вашей модели полагали, что зависимость между экспрессией гена *mmr3* активностью фермента это некая константа. А при том, что фермент сам достаточно сложно процессируется, насколько это предположение корректно (о снижении активности фермента *mmr3* в уменьшенных эмбрионах. Прим. Авт.)? Может быть, там когда чуть падает экспрессия, там, допустим, активность фермента совсем...
5. Вопрос следующий: потенциальные скейлеры и антискейлеры должны обязательно принадлежать к секретируемым белкам?

Соискатель Орлов Е.Е. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы:

1. Скейлеров скорее всего должно быть немного. Это может следовать из следующего рассуждения: если в системе будет много регуляторов, чья концентрация сильно изменяется, то это приведет к тому, что на систему будут сильно влиять случайные тепловые процессы. Возможно, при ограниченном количестве скейлеров этого не будет происходить.
2. Скорее всего, память сохраняется довольно длительное время, и эмбрионы-близнецы наверстывают упущенное.
3. *Mmr3* - это цинковая металлопротеаза. У неё очень консервативный каталитический домен. У *Mmr3* имеется продомен, который ингибирует каталитический центр до секреции, а также специфические домены на С-концевом участке, которые формируют специфичность фермента.
4. Да, мы не исследовали концентрацию *mmr3* в уменьшенных эмбрионах, а только экспрессию мРНК. Необходимо также измерить изменение концентрации белка в уменьшенных эмбрионах.
5. Да. Несекретируемые скейлеры могут присутствовать в других модельных объектах. Например, в моделях насекомых, где превалируют внутриклеточные градиенты.

На заседании 14 февраля 2024 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи теоретического обоснования возможности существования скейлеров и фактического обнаружения скейлеров в эмбриональном развитии, имеющей важное значение для исследований в области молекулярной биологии и биологии развития, присудить Орлову Евгению Евгеньевичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 7 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 - Молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 23, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель  
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

14 февраля 2024 г.