

ОТЗЫВ

официального оппонента Краус Юлии Александровны

на диссертацию Орлова Евгения Евгеньевича

«Секретируемая металлопротеиназа *Mmp3* как регулятор скейлинга системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Актуальность темы исследования

Работа, выполненная Евгением Евгеньевичем Орловым, посвящена одной из наиболее актуальных тем современной биологии развития - эмбриональной регуляции. Эмбриональная регуляция - это способности эмбриона к восстановлению и формированию нормального плана строения при нарушении его структуры и даже удалении отдельных частей в эксперименте. С развитием методов молекулярной биологии, таких как функциональный анализ и анализ транскриптомов, наиболее актуальными стали работы, посвященные конкретным молекулярным механизмам эмбриональной регуляции. В более широком аспекте, эти работы направлены на изучение механизмов, благодаря которым интактный эмбрион в ходе нормального развития поддерживает целостность своей организации и процессов развития. Работа Е.Е. Орлова, цель которой экспериментальная проверка гипотезы о существовании специальных генов-скейлеров с экспрессией, зависящей от размера эмбриона, безусловно актуальна для современной молекулярной биологии, биологии развития и эволюционной биологии.

Научная новизна и практическая значимость работы

Научная новизна использованных в работе Е.Е. Орлова подходов и методов, а также полученных в работе результатов не вызывает сомнений.

В данной работе впервые высказывается в явном виде и обосновывается предположение о новом механизме, на котором основана эмбриональная регуляция, связанная с поддержанием стабильного соотношения размеров частей эмбриона. Автор предположил, что изменение размера эмбриона приводит к резкому изменению концентрации веществ - модуляторов морфогенетических градиентов, названных автором «скейлерами». Идея автора состоит в том, что изменение концентрации скейлера влияет на градиенты молекул-регуляторов морфогенетических процессов, подстраивая молекулярную предразметку плана строения эмбриона под изменившиеся условия.

Это предположение было высказано на основе численного анализа ранее опубликованных моделей эмбриональной регуляции. Корректность выдвинутой гипотезы была проверена с помощью сравнительного анализа транскриптомов, полученных от экспериментальных эмбрионов *Xenopus*. Эти эмбрионы развивались из одного из первых двух бластомеров, то есть были уменьшены в два раза по сравнению с контролем. Автору удалось обнаружить, что одним из наиболее дифференциально экспрессирующихся генов является ген матричной металлопротеиназы-3 (*mmp3*). Было впервые показано, что продукт этого гена участвует в корректировке разметки дорзо-вентральной оси эмбриона с помощью

модуляции BMP-каскада. Было сделано заключение о том, что данный белок удовлетворяет требованиям, предъявляемым автором к веществам-скейлерам.

Кроме того, автором была исследована функциональная активность матриксной металлопротеиназы-3 и обнаружены два её новых субстрата, с помощью которых данный фермент осуществляет модуляцию градиента BMP-каскада. Это белки Noggin 1/2 и Tolloid-like1.

Таким образом, автором были получены следующие наиболее значимые результаты: (1) сформулирована и подтверждена гипотеза о наличии в системе регуляции эмбрионального развития скейлеров - модуляторов морфогенетических градиентов; (2) был разработан и успешно апробирован метод поиска генов-скейлеров, экспрессия которых чувствительна к изменению размеров эмбриона.

Полученные результаты вносят заметный вклад в развитие фундаментальных научных дисциплин - молекулярной биологии, эмбриологии и эволюционной биологии развития. Кроме того, данные о работе матриксной металлопротеиназы-3 имеют значение для медико-биологических исследований, поскольку этот фермент вовлечен в различные патологические процессы.

Можно ожидать, что работа подобных генов будет впоследствии изучена и в других модельных системах; выявление нового механизма эмбрионального скейлинга открывает новые перспективы для изучения регуляции развития.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Все эксперименты проведены на выборках достаточных размеров. Результаты всех экспериментов проанализированы с использованием строгих статистических критериев, их достоверность не вызывает сомнений. Выводы, сделанные автором, полностью обоснованы, соответствуют поставленной цели и задачам работы.

Структура и содержание работы

Работа изложена на 151 странице, включает 39 рисунков, 7 таблиц и 295 ссылок на литературные источники. В работе имеются 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.

Обзор литературы

Первая часть раздела посвящена истории исследования феномена эмбриональной регуляции начиная с опытов В. Ру и Г. Дриша. В разделе также дается сравнительная характеристика эмбриональных регуляций у различных животных. Особое внимание уделяется роли индукционных взаимодействий и регионов-организаторов в регуляции формирования плана строения как позвоночных, так и беспозвоночных животных.

Далее в Обзоре затрагиваются процессы формирования дорзо-вентральной полярности, молекулярные механизмы предразметки дорзо-вентральной оси тела и формирования шпемановского организатора позвоночных. Особенно подробно разбираются

молекулярные механизмы разметки плана строения, основанные на активности BMP сигнального каскада.

Последняя часть обзора посвящена молекулярным механизмам скейлинга, обеспечивающего стабильное соотношение частей тела у развивающегося эмбриона. Начинается этот подраздел с исторической части, т.е. с модели «французского флага» Л. Вольперта. Заканчивается подраздел современными моделями, в которых вводятся параметры, позволяющие корректировать градиенты морфогенов. В число этих моделей входят и те, которые разрабатываются в коллективе, где работает автор исследования.

В целом Обзор литературы написан хорошим научным языком, хорошо проиллюстрирован, подробно знакомит читателя с областью исследования и не вызывает критических замечаний.

Результаты

Автор в ходе работы использовал широкий спектр современных подходов и методов молекулярной биологии развития, эмбриологии, биоинформатики.

Раздел начинается с краткого описания анализа параметров моделей эмбриональной регуляции, результаты которого были опубликованы автором в 2022 году. Было проанализировано поведение градиента морфогена у интактных и уменьшенных эмбрионах. Вычислялся параметр, характеризующий инвариантность градиента при скейлинге (Scaling score, Ss), а также параметр, характеризующий изменение концентраций веществ при скейлинге (Scaling ratio, Sr). Оказалось, что чем выше качество скейлинга градиента в модели (большие значения Ss), тем больше должны различаться концентрации гипотетических модуляторов скейлинга у эмбрионов нормального и уменьшенного размера. Такие модуляторы были названы автором «скейлерами», то есть веществами, которые осуществляют скейлинг эмбриона.

Далее автор описывает поиск кандидатов на роль генов-скейлеров в избранной им модельной системе - регуляции развития эмбрионов *X. laevis*, полученных из одного из двух первых бластомеров или из половинок бластулы.

Для создания модели регуляции развития использовались методы экспериментальной эмбриологии (разделение бластомеров, разрезание эмбрионов, культивирование уменьшенных эмбрионов).

Поиск генов-скейлеров был проведен с помощью вычитающего РНК-секвенирования, а результаты секвенирования были проверены методом количественной ПЦР в реальном времени. В результате анализа транскриптомов был получен список генов, дифференциально экспрессирующихся между контрольными эмбрионами и эмбрионами, экспериментально уменьшенными в 2 раза. Наиболее привлекательным геном-кандидатом был признан ген матричной металлопротеиназы-3 (*mmp3*). Экспрессия этого гена была подробно исследована у интактных эмбрионов методом гибридизации *in situ*.

Для того, чтобы определить, действительно ли *mmp3* вовлечен в разметку и корректировку разметки плана строения, автор выполнил ряд функциональных экспериментов с интактными и уменьшенными эмбрионами. Последствия любого экспериментального

воздействия контролировались с помощью гибридизации *in situ*, причем площадь экспрессии генов-маркеров измерялась, а достоверность различия площадей оценивалась статистическими методами.

Был использован метод специфичного подавления трансляции белка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов (т.н. «морфолино»). Например, инъекция морфолино к *mmp3* приводила к уменьшению нервной пластинки и сомитной мезодермы интактного эмбриона, что подтверждалось изменением паттернов экспрессии генов-маркеров этих структур (*sox2* и *cardiac actin*). Также был использован метод инъекции мРНК *Mmp3* для имитации оверэкспрессии *mmp3* в интактных и уменьшенных эмбрионах. Наконец, выполнялся нокаут *mmp3* с помощью метода CRISPR-Cas9.

В целом, была подтверждена функциональная значимость изменения уровня экспрессии *mmp3* для предразметки интактного эмбриона и для корректировки предразметки уменьшенного эмбриона.

Поскольку в разметку дорзо-вентральной оси у эмбрионов амфибий вовлечен в первую очередь BMP-каскад, в работе был проведен также поиск возможных субстратов *Mmp3*. В результате удалось обнаружить два субстрата: ингибиторы BMP-каскада *Noggin 1* и *2*, а также протеиназу *Tolloid-like1*. В этой части работы использовался метод Взаимодействия этих белков были исследованы методами белковой химии (вестерн-блоттинг и ко-иммунопреципитация). Взаимовлияние продуктов исследуемых генов изучалось с помощью их одновременного нокаута в разных сочетаниях (например, нокаут *chordin+noggin1/2* или *mmp3+noggin1/2*).

На основе экспериментальных результатов была сформулирована модель взаимодействия молекул *Mmp3*, *Chordin* и *Noggin1/2*. Проверка модели была выполнена с помощью сравнения градиентов активности BMP-каскада в уменьшенных эмбрионах и в интактных эмбрионах с подавленной экспрессией *mmp3*.

С моей точки зрения, самый интересный и красивый результат работы - то, что в ходе развития инъекцированные *mmp3-МО* эмбрионы уменьшали свой размер по сравнению с неинъекцированными. То есть эмбрионы «подгоняли» свой размер под концентрацию вещества-скейлера. Именно этот результат наиболее убедительно показывает роль продукта гена *mmp3* в регуляции развития.

Обсуждение

Обсуждение представляет собой, скорее, заключение. Оно написано всего на трёх страницах и, в целом, неплохо подводит итоги работы.

Выводы

В работе сформулировано 6 выводов, которые полностью соответствуют как полученным результатам, так и целям и задачам исследования.

Материалы и методы

Раздел написан подробно, информации достаточно для воспроизведения проведённых автором экспериментов.

Замечания к диссертационной работе

Основное замечание, которое у меня имеется к работе - 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 секретлируемые белки Noggin1 и 2 и препятствует деградации Chordin путем разрушения металлопротеиназы Tolloid-like1». Также внутри каждого подраздела сгруппированы результаты, полученные в ходе нескольких экспериментов. Так, в подразделе 7.4. «Нокдаун *ttnr3* приводит к уменьшению сомитной мезодермы и нервной пластинки, но одновременно к увеличению нотохорда» речь идет далеко не только об экспериментах по нокдауну *ttnr3*, но и об экспериментах по «спасению» эмбрионов, а также по оверэкспрессии *ttnr3* и по нокауту *ttnr3* 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 очень плотно насыщена данными, которые нуждаются в более развернутом 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 *ttnr3*-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).

В ходе знакомства с работой у меня возник вопрос к автору. В работе утверждается, что «Уменьшение количества инъецированного *ttnr3*-МО в два раза (до 2.5 пмоль/эмбрион), а также нокаут *ttnr3* с помощью CRISPR-Cas9 (35%, n=250), значительно увеличивало долю правильно сложенных уменьшенных головастика в эксперименте...». Как автор объясняет то, что противоположные по эффекту воздействия привели к одному и тому же результату?

Высказанные замечания не влияют на высокую оценку научной составляющей работы. Автор выполнил очень интересное исследование которое, фактически, открывает новое направление в изучении эмбриональных регуляций.

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*» 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 Е.Е. Орлов несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент

Краус Юлия Александровна

доктор биологических наук,
(специальность 03.03.05 – Биология развития, эмбриология)
ведущий научный сотрудник
кафедры биологической эволюции биологического
факультета Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова».

26 января 2024 года

Контактные данные:

Телефон: +7 495 9393501, e-mail: yulia_kraus@mail.ru
Адрес: 119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1, стр. 12
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
биологический факультет

Подпись сотрудника биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
Ю.А. Краус удостоверяю:

Заместитель декана биологического факультета МГУ
имени М.В.Ломоносова, профессор, дбн

А.М. Рубцов

