

## ОТЗЫВ

официального оппонента Адамейко Игоря Игоревича

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

Понимание механизмов определяющих последовательное масштабирование (скейлинг) и конечный размер тела растущего эмбриона является важным биологическим вопросом. В самом деле, конечный размер эмбриона влияет на динамику формирования органов, их взаимное расположение и функциональность. Кроме того, размеры эмбриона определяют скорость и устойчивость его развития. В конечном итоге, процесс эмбриогенеза завершается ювенильным животным, размеры тела которого точно приспособлены к экологической нише данного вида, что в свою очередь, крайне важно для выживания молодого организма и продолжения рода. Аномалии размера тела могут приводить к потере конкурентоспособности в рамках естественного отбора. В соответствии с этим, размер тела ювенильных и взрослых животных является достаточно стабильным и генетически-определяемым фактором несмотря на вклад среды и возможные внешние влияния на динамику роста. Более глубокое понимание механизмов контроля размера эмбриона и ювенильного животного позволит лучше осмыслить глобальный биологический вопрос – почему все животные такие разные, включая их размер, а также как такой важный параметр как размер меняется в ходе эволюционных адаптаций – какие гены и молекулы являются в этом случае эволюционным субстратом. Также, понимание механизмов, ограничивающих нормальный рост, может дать новый импульс в отношении исследований природных принципов, противодействующих развитию неконтрольного роста ткани, как, например, в случае раковых образований.

Одной из существующих проблем в изучении контроля масштабирования органов и общего размера эмбрионов является сложность точного исследования потенциальных молекулярных и клеточных механизмов в динамике. Развивающийся эмбрион постоянно меняется, и для понимания этих изменений требуются высокоточные методы измерения функциональных экспериментальных воздействий и их анализа. К тому же, необходимо учитывать влияние различных комбинаций факторов, таких как генетика, окружающая среда и наличие питательных веществ, на механизмы, контролирующие общий размер и масштаб органов эмбриона. Также необходимо выяснить, как различные клеточные и молекулярные процессы взаимодействуют на разных уровнях для обеспечения согласованного роста и пропорционального развития всех частей и тканей эмбриона, так называемого «скейлинга». Это требует комплексного подхода к изучению этого вопроса, включая генетический, биохимический, молекулярно-биологический и физиологический анализ.

Работа диссертанта, Евгения Евгеньевича Орлова, посвящена влиянию гена-скейлера матриксной металлопротеазы-3 на регуляцию паттерна эмбриона шпорцевой лягушки при внешнем воздействии на его размер. Изучение процессов регуляции паттерна при оперативном изменении размера эмбриона является одной из главных тем экспериментальной эмбриологии с момента ее появления, и описание и поиск молекулярных механизмов такой регуляции составляет одну из наиболее трудных задач биологии развития. В рассматриваемой работе было высказано и обосновано



предположение, что изменение размера эмбриона повлечет за собой сильное изменение концентрации специальных регуляторов, названных в работе скейлерами, и это изменение можно будет выявить с помощью омиксных технологий, в данном случае с помощью транскриптомного секвенирования. Более того, был изучен механизм действия одного из скейлеров – матриксной металлопротеазы 3. Выявление подобных скейлеров, безусловно, было бы важным шагом к открытию новых способов регуляции в эмбрионах, поэтому актуальность данной работы несомненна.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

В данной работе впервые показано, что существующие модели эмбриональной регуляции неявно подразумевают наличие особых веществ, преимущественно белков, названных скейлерами, чья концентрация сильно меняется во время регуляции. Это утверждение далее рассматривалось в качестве гипотезы, на основании которой был предпринят поиск скейлеров в живых системах. Поскольку изменение концентрации белка может регулироваться на транскрипционном уровне, впервые был выбран метод вычитающего секвенирования транскриптомов эмбрионов шпорцевой лягушки, где сравнивались уровни экспрессии РНК в обычных эмбрионах; и эмбрионах, полученных из первых разделенных бластомеров. В результате секвенирования был выявлен ряд генов с дифференциальной экспрессией, и среди них ген матриксной металлопротеазы 3 (*mmp3*), который и был проверен на способность модулировать градиенты морфогенов, то есть, на наличие свойств скейлера. Было впервые продемонстрировано, что ген *Mmp3* (*mmp3*) регулирует дорзо-вентральную разметку эмбриона при эмбриональной регуляции, а также были описаны новые субстраты для матриксной металлопротеазы 3: белки Толлоид (Tolloid) и Хордин (Chordin). Был впервые описан механизм, за счет которого ген *Mmp3* регулирует дорзо-вентральную разметку, воздействуя на Толлоид и Хордин. Кроме того, в работе была предложена новая модель, согласно которой дорсальные зачатки эмбриона лягушки реагируют на время экспозиции к BMP-лигандам, а вентральные – на концентрацию BMP-лигандов.

Таким образом, в диссертационной работе было впервые предположено и экспериментально доказано наличие скейлеров. Данный результат имеет большую практическую значимость, поскольку метод, примененный в работе, может быть использован на большом количестве моделей для поиска новых механизмов регуляции зародышей. Кроме того, были описаны новые субстраты для белка матриксной металлопротеазы 3, что имеет несомненную ценность для биомедицинских исследований.

### **Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов**

Результаты NGS-секвенирования корректны и статистически значимы, а их предсказания продуктивно подтверждены последующими экспериментами. Все эксперименты произведены с использованием численных методов анализа изображений и корректных статистических оценок и, таким образом, не вызывают сомнений.

### **Структура и содержание работы**

Работа изложена на 151 странице и имеет 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. В работе 39 рисунков, 7 таблиц и 295 процитированных источников. Структура диссертационной работы Е.Е. Орлова стандартна. Во введении автор сначала дает краткую историю изучения эмбриональной регуляции, современное состояние проблемы, и затем формулирует цели и задачи исследования. Затем во «Введении» дается краткое описание работы и краткие выводы. В целом, «Введение» кратко отражает все содержание работы. Раздел «Обзор литературы» посвящен нескольким взаимосвязанным в контексте диссертационной работы темам: истории изучения явления эмбриональной регуляции, молекулярным механизмам формирования дорзо-вентральной полярности, молекулярным механизмам эмбриональной регуляции, и, наконец, механизмам регуляции дорзо-вентральной оси. В целом, обзор литературы выполнен на высоком уровне и дает хорошее понимание экспериментальной работы. Раздел «Результаты» состоит из 8 подразделов, в которых описывается ход работы. В первом разделе «Результатов» проводится исследование параметров уже существующих на данный момент моделей эмбриональной регуляции. В ходе этого тестирования выяснилось, что в таких моделях всегда присутствует агент с сильно меняющейся концентрацией в зависимости от размеров «реактора»-эмбриона. Такой агент служит в качестве модулятора градиентов морфогенов в таких саморегулирующихся системах. Такие вещества были названы «скейлерами» и сделано предположение о возможности поиска новых скейлеров в живых системах с помощью NGS-секвенирования. Во втором разделе описан опыт по индуцированию процесса эмбриональной регуляции с помощью разделения первых двух бластомеров эмбрионов шпорцевой лягушки с последующей инкубацией до нужной стадии гастролы. Затем, с целью поиска скейлеров, описан процесс выделения мРНК из эмбрионов нормального и уменьшенного размера для вычитающего NGS-секвенирования. Среди полученных дифференциальных транскриптов был выбран вероятно наиболее подходящий под определение «скейлер» ген матриксной металлопротеиназы-3, секретлируемого фермента внеклеточного матрикса, экспрессия которого уменьшалась в регуляторных зародышах примерно в 10 раз. В третьем разделе проанализирован паттерн экспрессии гена матриксной металлопротеиназы-3 в раннем развитии и показано наличие экспрессии этого гена в области щели Браше эмбриона – особой зоне внеклеточного пространства между эктодермальным и мезодермальным зародышевыми листками, куда предположительно секретировались морфогены, размечающие эти листки вдоль дорзо-вентральной оси. Из этого было сделано предположение, что матриксная металлопротеиназа-3 регулирует дорзо-вентральную ось при регуляции. В четвертом разделе произведено исследование влияния нокдауна гена матриксной металлопротеиназы-3 в эмбрионах: нокдаун гена с помощью морфолино вызывал серьезные аномалии дорзо-вентральной оси, а именно уменьшение сомитной мезодермы и сужение нервной пластинки, а также увеличение ното хорды. Затем эти результаты сравнивались с процессами переразметки регуляторных эмбрионов, у которых также наблюдалось ожидаемое сужение нервной пластинки и сомитов, но при этом наблюдался относительно непропорционально крупный зачаток хорды. Восстановление экспрессии гена матриксной металлопротеиназы-3 в регуляторных эмбрионах приводило к обратному эффекту: сомиты и нервная пластинка увеличивались, а нотохорд уменьшался, что явно свидетельствовало в пользу того, что именно за счет изменения экспрессии матриксной металлопротеиназы-3 в саморегулирующемся эмбрионе происходит регуляция размеров его основных зачатков и таким образом показано, что матриксная металлопротеиназа-3 является «скейлером». Пятый раздел посвящен химизму наблюдавшихся явлений, а именно переразметки дорзо-вентральной оси. Для этого выбирались наиболее известные морфогены, которые размечают эту ось, и затем их проверяли на способность быть субстратом для матриксной металлопротеиназы-3 с помощью ко-инъекций мРНК морфогена и мРНК *mmp3* с последующим анализом деградации морфогена с помощью вестерн-блота. Таких морфогенов в работе было



выявлено два: протеиназа Tolloid и белки Noggin1 и 2. Кроме этого, влияние подавления *mmp3* на концентрацию Noggin2 *in vivo* было подтверждено напрямую с помощью нокдауна *mmp3* в эмбрионах и последующим сравнением концентрации эндогенного Noggin2 в межклетниках эмбрионов с помощью вестерн-блоттинга. Далее, так как Tolloid наиболее известен как фермент, расщепляющий морфоген Chordin, в данном разделе также показано, что подавление функции *mmp3* в эмбрионах (как в целых с помощью нокдауна, так и в регуляторных за счет «естественного» снижения экспрессии *mmp3*) приводит к снижению концентрации Chordin в межклеточной жидкости. То есть, в результате было определено две различные мишени для фермента: активность Mmp3 снижает концентрацию Noggin1 и 2, и повышает у Chordin. В шестом разделе доказывалось, что Mmp3 стабилизирует Chordin именно посредством разрушения протеиназы Tolloid с помощью анализа взаимодействия соответствующих генов. При нокдауне только Mmp3 происходит расширение вентрального зачатка, а при совместном нокдауне *mmp3* и *tolloid* происходит его обратное сужение. Наконец, дополнительный нокдаун *chordin* опять расширяет вентральный зачаток, что безусловно говорит об эпистазе генов. В седьмом разделе производится попытка дифференциации вклада обоих субстратов Mmp3, а именно белков Noggin и Chordin, в наблюдаемую переразметку при уменьшении эмбрионов. Так, в опытах с двойными нокаутами *mmp3* и *noggin1/2* показано, что увеличение концентрации Noggin1 и 2 при снижении экспрессии *mmp3* ответственно за увеличение размера зачатка хорды, но не ответственно за сужение сомитов и нейроэктодермы. И наоборот – показано, что снижение концентрации Chordin при подавлении *mmp3* ответственно за сужение сомитов и нейроэктодермы. В восьмом разделе формулируется модель на основе наблюдаемых данных: и Noggin и Chordin являются секретруемыми ингибиторами BMP-каскада. Однако, диффузионные свойства их сильно различаются. Chordin – быстро диффундирующий белок, формирующий пологий градиент вдоль дорзо-вентральной оси. Поэтому снижение его концентрации в первую очередь скажется на размере латеральных зачатков: сомитов и нейроэктодермы. Напротив, Noggin1 и 2 более неподвижны. Поэтому они скапливаются в месте секреции – на дорсальной стороне. Поэтому увеличение их концентраций за счет подавления *mmp3* приводит к расширению наиболее дорсальной структуры – нотохорда. Помимо модели в разделе присутствует опыт по непосредственному измерению градиентов активности BMP-каскада при подавлении *mmp3* и также анализируется вклад *noggin2* в эти изменения. В разделе «Обсуждение» произведен корректный анализ результатов, а также формулируется гипотеза о различных механизмах активации BMP-каскада вдоль дорзо-вентральной оси. В разделе «Выводы» выведены 6 пунктов, выведенных на защиту, которые не вызывают возражений.

В конечном итоге, используя модель развития шпорцевой лягушки, диссертант определил, что матриксная металлопротеиназа-3 играет ключевую роль в закладке пространственных паттернов и регуляции роста, действуя как "скейлер", и влияет на пропорциональные размеры всех основных зачатков эмбриона. В ходе данного исследования также предложена новая модель, объясняющая, как различные субстраты фермента влияют на формирование дорзо-вентральной оси эмбриона. Исследование завершается формулировкой выводов, подтверждающих гипотезу о различных механизмах активации BMP-каскада, и предлагает новые направления для дальнейшего изучения этой темы. В завершение можно сказать, что данное исследование достаточно беспрецедентно в плане значимости конечного открытия – молекулярных механизмов скейлинга, а также представляет собой редкий случай работы, где полнота исследования просматривается с начала применения описательных методов, таких как NGS секвенирование, переходящих в полный экспериментальный цикл проверки предсказаний с успешным завершением (что определилось большим трудом и высоким интеллектуальным уровнем диссертанта). Уровень главного открытия в данной работе весьма высок и заметен на глобальном и интернациональном масштабе биологии развития и регенеративной медицины.



## Замечания к диссертационной работе

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.

## 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 Евгений Евгеньевич несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Руководитель Лаборатории нейроиммунологии  
Центра изучения мозга Венского медицинского университета,  
д.б.н., профессор  
Игоревич

4 Spitalgasse, Wien, 1090, Austria  
E-mail: [igor.adameyko@gmail.com](mailto:igor.adameyko@gmail.com)

18.01.2024

Подпись д.б.н. Адамейко И.И.  
«Удостоверяю»  
Assoc. Prof. Dr. Венского медицинского университета

Medizinische Universität Wien  
Zentrum für Hirnforschung  
Abteilung für Neuroimmunologie  
A-1090 Wien, Spitalgasse 4



MEDIZINISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN

ZENTRUM FÜR HIRNFORSCHUNG

Адамейко Игорь

д.б.н. Романов Р.А.  
(Dr. Roman Romanov)