



**МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
( МГУ )**

Ленинские горы, Москва,  
ГСП-1, 119991  
Телефон: 939-10-00  
Факс: 939-01-26

*07.08.2014 № 193-14/013-03*

На № \_\_\_\_\_



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор –  
начальник Управления научной политики  
и организации научных исследований  
МГУ имени М.В.Ломоносова А.А.Федянин

« 31 » *август* 2017 г.

**ОТЗЫВ**

**ведущей организации на диссертацию Александра Владиславовича Бородулина на тему «Секретируемый белок Noggin4 – новый регулятор активности Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального каскада в раннем эмбриональном развитии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»**

Диссертационная работа А.В.Бородулина посвящена изучению молекулярной функции и физиологической роли одного из гомологов семейства секретируемых белков Noggin – Noggin4. В работе при помощи широкого спектра перспективных современных исследовательских инструментов молекулярной биологии и экспериментальной биологии индивидуального развития изучена функция Noggin4 как негативного регулятора сигнального пути Wnt/ $\beta$ -catenin в раннем эмбриональном развитии шпорцевой лягушки и математически смоделировано его влияние на градиент активности сигнальной молекулы Wnt8 в нервной пластинке.

**Научная и практическая актуальность темы работы определяется важной ролью, которую играет сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -catenin. В работе установлено, что секретируемый**

белок Noggin4 представляет собой внеклеточный ингибитор Wnt/ $\beta$ -catenin-каскада. Ввиду высокой физиологической значимости данного сигнального пути и его глубокой вовлеченности в целый ряд важнейших нормальных и патологических процессов как в эмбриональном развитии, так и в физиологии взрослого организма, изучение его регуляции представляет актуальную научную проблему. Выяснение тонких деталей этой регуляции имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, снабжая биомедицинскую науку новой ценной информацией, которая может быть полезна при разработке лекарственных препаратов и стратегий терапии разных патологических процессов, связанных с нарушением функции Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального каскада.

**Научная новизна** работы А.В.Бородулина определяется тем фактом, что на модели зародыша шпорцевой лягушки впервые получены данные о механизмах регуляции белком Noggin4 сигнальной активности Wnt/ $\beta$ -catenin-пути и описаны уникальные для молекул этого класса свойства данного белка.

В работе впервые проведен сравнительный анализ экспрессионных профилей гомологов Noggin4 в раннем эмбриональном развитии двух видов, принадлежащих эволюционно дистантным ветвям позвоночных – бесхвостым амфибиям (*Xenopus laevis*) и птицам (*Gallus gallus*); показан консервативный характер экспрессии изучаемого белка.

Получены новые данные относительно молекулярных партнеров Noggin4 и процессов, на которые он способен влиять. Показано, что Noggin4 не влияет на активность BMP- и Nodal/Activin-сигнальных каскадов и не связывает их специфические лиганды. В то же время, обнаружена способность Noggin4 взаимодействовать с лигандом Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального каскада – Wnt8 – *in vitro* и *in vivo*, препятствовать взаимодействию Wnt8 со специфическими мембранными рецепторами и блокировать сигнальную активность данного пути.

При помощи искусственно созданных генетических конструкций, в состав которых введены кодирующие рамки разных секретлируемых белков (Noggin1, Noggin2, Noggin4, Wnt8 и т.д.) с флюоресцентными метками (EGFP, TagRFP), на основании метода FRAP разработан оригинальный метод прижизненной визуализации распределения секретлируемых белков в тканях живого зародыша *Xenopus laevis*. С помощью этого метода экспериментально обнаружено предсказанное по первичной структуре гена *noggin4* уникальное для молекул этого класса свойство белка Noggin4 быстро диффундировать в тканях живого зародыша и функционировать в качестве дальнедействующего ингибитора сигнального пути Wnt/ $\beta$ -catenin. Вычислена скорость перемещения (коэффициент диффузии) белка Noggin4 и его гомологов в межклеточном пространстве зародыша. Обнаружено, что по этому показателю Noggin4 более чем на порядок превосходит своих гомологов.

На основании полученных таким образом результатов разработана математическая модель регуляции белком Noggin4 градиента сигнальной активности Wnt/ $\beta$ -catenin-пути в процессе разметки нервной пластинки зародыша *Xenopus laevis*.

**Практическая значимость.** Работа в основном носит фундаментальный характер. Обнаруженные и описанные свойства белка Noggin4 делают его уникальным дальнедействующим ингибитором Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального пути и регулятором клеточной дифференцировки, потенциально вовлеченным в базовое для эмбриональных систем и малоизученное явление скейлинга, или размерной инвариантности эмбрионального паттерна – способность развивающейся системы воспроизводить паттерн при существенных помехах, например, при удалении у зародыша существенной части клеточного материала.

Результаты работы вносят существенный вклад в понимание базовых механизмов развития и его эмбриональной регуляции, а также регионализации центральной нервной системы в раннем развитии.

Разработанные автором подходы и полученные данные могут быть в дальнейшем использованы в биомедицинских исследованиях, при изучении и разработке терапевтических подходов в отношении ряда патологий, в частности, онкологических заболеваний, пороков развития, заболеваний ЦНС и т.п.

**Структура диссертации,** изложенной на 152 страницах машинописного текста, включает стандартные главы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, выводы, материалы и методы исследования. Список литературы насчитывает 379 источников. Работа иллюстрирована 30 рисунками, вынесенными в два приложения – к разделам «Обзор литературы» и «Результаты и обсуждение».

Во **Введении** приводится краткая общая информация о современном положении в данной области и об объекте исследования, обосновывается тема работы, научная новизна, практическая значимость полученных результатов и выбор животной модели (зародыш шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*).

**Обзор литературы** представляет собой подробное рассмотрение механизмов реализации сигнальной активности Wnt/ $\beta$ -catenin-пути (его внеклеточные лиганды и различные классы специфических поверхностных клеточных рецепторов, участие G-белков в Wnt-сигнализации). Большое внимание уделено описанию регуляции активности этого сигнального пути при помощи секретируемых и трансмембранных ингибиторов и активаторов. Кроме того, рассмотрены разные механизмы распределения сигнальных белков класса Wnt в тканях – свободная диффузия, перемещение при помощи белков-переносчиков, везикулярный и цитонемный транспорт белков Wnt в межклеточном пространстве. Наконец, приведен обзор доступной информации по структуре, функции, экспрессии и молекулярной эволюции белков семейства Noggin.

Обзор снабжен 13 иллюстрациями, вынесенными в приложение, написан грамотно, охватывает широкий спектр публикаций преимущественно последних лет и, безусловно, свидетельствует, о глубоком понимании автором основ изучаемых молекулярных процессов, его широком научном кругозоре и солидной общетеоретической подготовке. В целом этот раздел работы дает подробное представление о предмете исследования и позволяет оценить важность и актуальность выбранного автором направления.

В разделе «**Результаты и обсуждение**» приведены полученные автором экспериментальные результаты, их теоретическое обобщение и обсуждение. Изучен экспрессионный профиль белка *Noggin4* в раннем развитии куриного зародыша и проведен сравнительный анализ с профилем экспрессии белка *Noggin4* зародыша шпорцевой лягушки, описанным ранее коллегами лаборатории, которой выполнялась работа. Автором установлен консервативный характер экспрессии *Noggin4* в гомологичных эмбриональных структурах двух эволюционно дистантных видов, из чего сделан вывод о высокой физиологической значимости функции *Noggin4* в раннем эмбриональном развитии позвоночных.

Изучено влияние смещения уровня экспрессии *Noggin4* на морфологию головных и осевых структур зародышей шпорцевой лягушки; при помощи метода гибридизации *in situ* установлены сдвиги паттернов экспрессии генов-маркеров переднеголовных структур при повышении и понижении уровня экспрессии *Noggin4*. Используя люциферазные репортерные конструкции, автором проведена оценка способности *Noggin4* влиять на активность разных сигнальных путей – BMP, Nodal/Activin, “канонический” Wnt. Полученные в этих экспериментах результаты автор интерпретировал в пользу способности *Noggin4* оказывать стимулирующее влияние на развитие переднеголовных структур через посредство молекулярных механизмов, не связанных с регуляцией сигнальных каскадов BMP и Nodal/Activin.

Далее приведены результаты ряда экспериментов по оценке способности *Noggin4* регулировать сигнальную активность каскада Wnt/ $\beta$ -catenin. Предсказана и экспериментально обнаружена способность изучаемого белка индуцировать развитие полных, включая головной отдел, вторичных осевых комплексов при его эктопической экспрессии с одновременным подавлением BMP-сигнализации – свойство, характерное для ингибиторов Wnt/ $\beta$ -catenin, что позволило автору предположить наличие у изучаемого белка ингибиторной активности в отношении этого сигнального пути. Эта гипотеза нашла подтверждение как в экспериментах с люциферазной репортерной плазмидой, специфически активируемой Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализацией – pTOPFlash, – так и в экспериментах по ко-иммунопреципитации белка *Noggin4* с предполагаемыми молекулярными партнерами, мечеными специфическими антигенными flag- и мус-эпитопами, в которых получены прямые доказательства способности белка *Noggin4* связывать Wnt8 при одновременной

неспособности связывать специфические лиганды других сигнальных путей. Эксперименты по оверэкспрессии внутриклеточного эффектора каскада –  $\beta$ -catenin – позволили локализовать активность Noggin4 на уровне не ниже основных рецепторов данного пути – Frizzled8. При помощи метода количественной полимеразной цепной реакции в работе показано, что искусственное повышение и понижение экспрессии Noggin4 вызывает ожидаемые синхронные изменения уровней экспрессии ряда генов-мишеней сигнального каскада Wnt/ $\beta$ -catenin – Axin2, HoxA1, HoxB1, HoxD1, Siamois и Xnr3.

Совокупность экспериментальных данных, полученных при помощи разных исследовательских инструментов и методик, позволила автору сделать вывод о том, что Noggin4 в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* связывается с секретлируемым лигандом Wnt/ $\beta$ -catenin – Wnt8 – и, таким образом, негативно регулирует активность данного каскада.

В этой части работы автор также уделяет внимание тому факту, что исследуемая активность белка Noggin4 зависит от способа его выделения: Noggin4 проявляет Wnt8-связывающую способность при селективном выделении из межклеточного пространства, но не из тотальных лизатов зародышей. Автор последовательно объясняет это тем, что в процессе секреции из клеток данные белки должны подвергаться дополнительному конформационному и модификационному изменению, отсутствующему при их прямом выделении из лизата эмбрионов.

Большое внимание в экспериментальной работе автор уделяет изучению распространения секретлируемого белка Noggin4 в межклеточном пространстве живого зародыша и нелокальным эффектам, оказываемым Noggin4 на индивидуальное развитие. Такие эффекты отмечаются как на уровне морфологии эмбриональных структур (билатеральное увеличение линейных размеров присоски при унилатеральной оверэкспрессии Noggin4), так и в отношении паттернов экспрессии переднеголовных генов-маркеров.

Наблюдаемые нелокальные эффекты Noggin4 автор объясняет обнаруженной способностью этого белка относительно свободно и быстро перемещаться в межклеточном пространстве. Особый интерес представляет описываемый в этой части работы разработанный автором оригинальный подход к изучению скорости распространения белков-морфогенов в межклеточном пространстве живого зародыша, который представляет собой модифицированную методику FRAP (восстановление флюоресценции после фотобличинга). Для проведения этих экспериментов автором созданы рекомбинантные генетические конструкции, в которые введены кодирующие рамки изучаемых белков с разными флюоресцентными метками, позволяющими визуально отслеживать их перемещение в межклеточном пространстве в режиме реального времени. Отмечается, что данная методика, модифицированная для отслеживания отдельных межклеточников, лишена

недостатков традиционного способа, при котором фотобличингу подвергается обширная квадратная область зародыша, содержащая множество клеток. Белки, использованные в этой серии экспериментов, были предварительно проверены на предмет сохранения ими физиологической активности и воспроизводимости эффектов своих флюоресцентно немеченных аналогов. Кроме того, была проведена оценка концентрации эндогенной мРНК *Noggin4* и вносимой в зародыш экзогенной мРНК его флюоресцентно меченного аналога.

В серии экспериментов по микрохирургической пересадке эксплантатов анимальной эктодермы зародышей, экспрессирующих флюоресцентно меченные белки семейства *Noggin*, на зародыши дикого типа автор наблюдал существенно различные скорости диффузии исследуемых рекомбинантных белков из эксплантата в окружающие ткани. Полученные данные позволили автору оценить и сравнить скорость распространения всех трех белков этого семейства – *Noggin1/2/4* – в эмбриональной эктодерме и обнаружить, что по этому параметру *Noggin4* более чем на порядок превосходит свои гомологи. В качестве возможного объяснения наблюдаемого эффекта автор предлагает факт отсутствия в функциональной структуре *Noggin4* сайтов связывания гепарансульфат-протеогликанов межклеточного матрикса, наличествующие в структуре его гомологов.

В теоретической части работы с учетом полученных данных, а так же опираясь на количественные экспериментальные оценки эффектов конкуренции эндогенного *Noggin4* за связывание *Wnt8* с одним из основных его рецепторов в передней эктодерме, *Frizzled8*, автором проведено математическое моделирование влияния белка *Noggin4* на форму сигнального градиента *Wnt8* в нервной пластинке зародыша шпорцевой лягушки и определена константа диффузии  $K_D$  *Noggin4* в межклеточном пространстве. Отмечается, что теоретические расчеты хорошо согласуются с полученными количественными данными экспериментов.

Раздел «Результаты и обсуждение» снабжен шестнадцатью иллюстрациями, вынесенными в отдельное приложение, после чего следует раздел «Выводы», где обобщены и по пунктам перечислены основные выводы диссертационной работы.

В главе «Материалы и методы» подробно приведены и описаны использованные в работе реактивы, животные модели и лабораторное оборудование, на котором проводилась работа, а также ряд методов, при помощи которых получены данные.

Методологические находки работы – зависимость функциональных свойств исследуемого белка от способа его выделения и модификация методики FRAP для целей изучения диффузии флюоресцентно меченных белков-морфогенов в индивидуальном межклетнике – безусловно, открывают перспективы их дальнейшего научного применения. Полученные данные представляют большой интерес и актуальны для широкого круга исследователей, работающих в областях биохимии, молекулярной биологии и

экспериментальной генетики индивидуального развития и изучающих как детали регуляции активности и функционирования Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального пути, так и механизмы разметки плана строения и размерной инвариантности (скейлинга) эмбрионального паттерна.

Представленные в диссертации материалы свидетельствуют об успешном и творческом решении поставленных задач и получении новых научных данных, имеющих фундаментальное и, потенциально, биомедицинское значение. Цели и задачи, поставленные в работе, достигнуты полностью.

**Апробация работы.** Основные результаты, полученные в работе, отражены в четырех статьях в зарубежных и отечественных рецензируемых научных изданиях и доложены на международной конференции. Опубликованные работы достаточно полно отражают основное содержание диссертации, а выводы адекватно обоснованы.

Результаты и выводы диссертации могут быть рекомендованы к использованию в исследованиях, проводящихся на биологическом, физическом и химическом факультетах Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, Институте физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Институте биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Институте биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАН и Институте биоорганической химии им. Акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова.

**Достоверность полученных результатов** не вызывает сомнений. Работа выполнена на высоком техническом и научном уровне, данные получены автором с использованием современных исследовательских подходов и методов – таких как молекулярное клонирование, гибридизация *in situ*, инъекции в зародыши шпорцевой лягушки синтетических мРНК и антисмысловых олигонуклеотидов, ко-иммунопреципитация и иммуноблоттинг, люциферазные репортерные конструкции, ПЦР в реальном времени, FRAP – и свидетельствуют об успешном решении поставленных задач. Выводы вытекают из представленных данных и полностью отражают результаты проведенных исследований.

**Замечания по диссертации.** Несмотря на весьма благоприятное общее впечатление от работы, она не лишена некоторых недостатков. В порядке замечания стоит отметить отсутствие в Обзоре литературы суммирующего заключения с кратким резюме современного состояния рассматриваемой области молекулярной генетики.

Помимо незначительных опечаток, стоит упомянуть отсутствие в тексте диссертации отдельного пункта с постановкой цели и задач работы, однако стоит отметить, что в автореферате диссертации такой пункт есть. В терминологическом отношении работа несколько мозаична, автор часто в одном контексте использует русские – «передне-задний» – и латинские – «дорсовентральный» – термины.

Эти замечания носят частный характер. Они не портят общего самого благоприятного впечатления о работе, не снижают ценности и достоверности полученных автором результатов и не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту.

В автореферате на 24 страницах представлены основные результаты, полученные А.В.Бородулиным в диссертационной работе, обоснована актуальность проблемы, научная новизна работы, ее практическая значимость, поставлены цели и задачи проводимого исследования. В автореферате излагаются все основные данные, полученные в работе, результаты обобщены и суммированы в виде выводов, а текст снабжен пятнадцатью иллюстрациями. Таким образом, содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

**Общее заключение.** Знакомство с диссертационной работой, авторефератом и публикациями А.В.Бородулина убеждает, что он является зрелым исследователем, способным осваивать и свободно оперировать широким арсеналом современных технических и методологических приемов молекулярной генетики, биоорганической химии и экспериментальной биологии индивидуального развития, обладающим достаточно глубокими знаниями в этих областях науки. Диссертационная работа Александра Владиславовича Бородулина на тему «Секретируемый белок Noggin4 – новый регулятор активности Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального каскада в раннем эмбриональном развитии» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей важное значение для развития исследований в области молекулярной биологии развития, направленных на поиск и изучение молекулярно-генетических механизмов раннего эмбрионального развития. Данная работа соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры эмбриологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (Протокол № 2, «31» января 2017 г.).

Профессор Кафедры эмбриологии  
Биологического факультета МГУ,  
доктор биологических наук



(В.А.Голиченков)

