

## ОТЗЫВ

**Официального оппонента на диссертацию  
Бородулина Александра Владиславовича  
«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**

### **1. Актуальность избранной темы.**

Исследования молекулярных и клеточных механизмов развития животных является современным, актуальным и динамичным направлением биологии, объединяющим различные области науки. Несмотря на стремительное развитие биологии развития, поиск и открытие механизмов, регулирующих детерминацию, специализацию и морфогенез развивающихся организмов, остается наиболее сложной и трудноразрешимой задачей. Исследование роли сигнальных путей, определяющих пространственно-временную организацию зародыша в раннем развитии животных, является важнейшим аспектом биологии развития, который активно изучается в ведущих мировых лабораториях. Однако в силу сложности и системности процессов развития для прогресса данной области необходимы нестандартные подходы для изучения механизмов сигнальной регуляции морфогенеза помимо классических молекулярно-генетических методов.

Диссертацию Бородулина Александра Владиславовича, посвященную поиску и установлению функциональных взаимодействий новых сигнальных регуляторов, изучению и моделированию пространственно-временного паттерна в раннем развитии позвоночных с использованием традиционных высокотехнологичных методов и новых нестандартных подходов, можно отнести к прорывным исследованиям в области молекулярной и клеточной биологии и биологии развития.

### **2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Обоснованность основных положений и выводов диссертационного исследования А.В. Бородулина обеспечивается современным уровнем и непротиворечивостью его исходных теоретических положений, постановкой адекватных и современных задач, логичностью плана исследования, применением надежных и апробированных методов, а

также разработкой новых подходов, соответствующих поставленным в нем цели и задачам, критичностью обсуждения результатов, корректной интерпретацией и количественным анализом полученных данных с использованием методов математического анализа, применяемых для биологических и медицинских исследований. Обоснованность научных положений и выводов исследования подтверждается тщательным сопоставлением собственных результатов с данными литературы.

### **3. Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

В соответствии с поставленной целью исследования автором удачно выбрана модель для решения задач исследований - эмбрионы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, логично сформулированы его задачи, для решения которых были последовательно использованы современные методы молекулярно-генетического и статистического анализов и математического моделирования. Достоверность проведенного автором исследования подтверждается большим экспериментальным материалом, полученным с помощью современных и адекватных методов анализа и тщательностью дизайна экспериментов.

Результаты и выводы диссертации А.В. Бородулина обладают новизной, актуальностью, фундаментальной и практической значимостью.

В диссертации впервые проведен сравнительный анализ паттернов экспрессии сигнального регулятора белка *Noggin4* в зародышах видов, относящихся к разным классам позвоночных (у бесхвостых амфибий и птиц) и обнаружено, что экспрессия гомологов *Noggin4* у разных классов позвоночных имеет консервативный характер, что свидетельствует о его значимости как регулятора развития осевых и головных структур в раннем эмбриогенезе. В работе впервые с высокой степенью доказательности, благодаря многочисленным приемам позитивно-негативного анализа функционального анализа сигналинга, тщательно и подробно исследована молекулярная и физиологическая функция белка *Noggin4*, его взаимодействия, влияния на потенциальные гены-мишени, регулирующие специализацию клеток и пространственно-временной паттерн развивающегося зародыша. Представляются особенно интересными и важными данные о различии молекулярных функций и биологической роли *Noggin4*, в отличие от других

белков роли Noggin1 и роли Noggin2: с помощью комплексного подхода с использованием различных флуоресцентных репортерных конструкций убедительно доказано, что Noggin4 не взаимодействует с сигнальными белками BMP, Nodal и Activin и не влияет на активность соответствующих сигнальных каскадов, однако Noggin4 способен ингибировать активность канонического Wnt/ $\beta$ -catenin пути, так как может связываться с сигнальным белком Wnt8 и препятствовать его взаимодействию со специфическими мембранными рецепторами. Используемые подходы являются традиционными для исследования сигнальных путей в клетках *in vitro*, но впервые применены авторами для моделей *in vivo*, что делает полученные результаты приоритетными и уникальными.

Кроме того, поистине уникальными можно считать эксперименты, проведенные с помощью конфокальной лазерной микроскопии FRAP и генетических конструкций с различными флуоресцентными метками. Автором диссертации вместе с коллегами была разработана технология прижизненной визуализации распределения и анализа сигнальных белков в тканях зародыша, которая впервые позволила установить характер распространения белка Noggin4 в межклеточном пространстве зародыша, вычислить и сравнить скорости перемещения флуоресцентно-меченных белков – Noggin4 и его гомологов. Благодаря этой новой методике было показано, что скорость распределения Noggin4 в межклеточных пространствах отдельных частей тела зародыша превышает скорости его гомологов более чем на порядок, что влияет на градиент распределения сигнальной активности Wnt, и, в конечном итоге, на процесс паттернирования раннего эмбрионального развития.

По моему мнению, главным достоинством диссертации является формулировка гипотезы и построение оригинальной модели регуляции градиента сигнальной активности Wnt8 белком Noggin4 в процессе ранней разметки нервной пластинки у эмбрионов *Xenopus laevis*. Эти результаты диссертационных исследований свидетельствуют о высоком уровне исследований и их значимости для фундаментальной науки.

#### **4. Значимость для науки и практики полученных автором результатов.**

Значимость для фундаментальной науки данной работы состоит в определении молекулярного паттерна, функциональной активности и функциональных взаимодействий нового сигнального регулятора - белка Noggin 4 - в ранних эмбрионах птиц и амфибий. На основании полученных результатов и математического анализа предложена



оригинальная модель модуляции белком Noggin4 градиента сигнальной активности лиганда Wnt8 в процессе раннего морфогенеза нервной пластинки у эмбрионов *Xenopus laevis*. Полученные данные важны для понимания фундаментальных закономерностей развития высших животных, механизмов регуляции паттернинга и скейлинга развивающихся организмов, регуляции сигнальных путей в клетках. Диссертационное исследование является отличным примером успешной методологической стратегии комплексного анализа механизмов детерминации клеток и морфогенетических преобразования в раннем развитии животных.

Прикладная значимость диссертации заключается в разработке нового подхода для изучения распространения секретлируемых белков в межклеточном пространстве зародыша с использованием генетических конструкций с флуоресцентными метками, позволяющий оценить реальную скорость перемещения секретлируемых белков на основе измерения кинетик времени полувосстановления флуоресценции после фотобличинга (FRAP) в индивидуальном межклеточном сегменте.

#### **5. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Полученные результаты и выводы диссертации соискателя могут быть рекомендованы для включения в курсы лекций при подготовке специалистов по молекулярной и клеточной биологии, физико-химической биологии и биологии развития. По-моему мнению, на основе разработанной методики для изучения распространения секретлируемых белков в межклеточном пространстве зародыша или тканей могут быть созданы и коммерциализированы новые алгоритмы для программного обеспечения конфокальных микроскопов или других приборов для *in vivo* анализа.

#### **6. Характеристика содержание диссертации, ее завершенности.**

Диссертационная работа А.В. Бородулина написана по традиционному плану. Текст диссертации изложен на 152 страницах, содержит 43 рисунка, одну таблицу и одну схему. Список литературы включает 379 цитируемых источников. Диссертационная работа А.В. Бородулина состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов исследований, заключения, основных выводов, списка использованных источников. Во введении автор обосновал актуальность и научную новизну диссертации, однако во введении самой диссертации автор почему-то не



перечислил цели и задачи исследования, которые присутствуют в автореферате диссертации.

В обширном обзоре (60 стр.) автор сделал подробную характеристику и анализ известных механизмов регуляции сигнальных путей факторов Wnt, представил современные данные о секретируемых и трансмембранных регуляторах и активаторах этого сигналинга. Отдельное внимание в обзоре уделено рассмотрению известных данных о структуре, экспрессии, функции и роли белков семейства Noggin в регуляции развития эктодермальных и мезодермальных производных. Обзор хорошо структурирован, содержит обширную современную информацию по изучаемым вопросам из разных областей биологии, что свидетельствует о высокой эрудиции автора. Обзор литературы в диссертации А.В. Бородулина представляется хорошим аналитическим исследованием, который было бы полезно опубликовать в виде отдельной статьи.

Глава, посвященная описанию материала и методикам, использованным в работе, написана достаточно подробно и дает представление о высокой квалификации диссертанта, профессионально владеющего самыми современными методами молекулярной и клеточной биологии, биологии развития. Диссертация содержит описание 25 разнообразных современных методов, что значительно превосходит среднестатистические кандидатские диссертации. Все исследования выполнены с помощью стандартизованных методов и приборов, количественные данные подвергнуты корректной статистической обработке.

В главе «Результаты» автор последовательно приводит полученные им данные изучения структуры и паттерна у ранних эмбрионов и птиц и затем влияние экспрессии Noggin4 на развитие осевых структур у эмбрионов шпорцевой лягушки. Необходимо отметить, что Noggin4 был впервые идентифицирован в лаборатории А.Г. Зарайского, поэтому все полученные данные диссертанта о данном сигнальном модуляторе являются приоритетными.

Особый интерес представляют результаты последовательного исследования функциональных свойств Noggin4 и его способности индуцировать развитие вторичных осевых структур у зародышей. Эти эксперименты убедительно показали, что Noggin4 является мощным негативным регулятором Wnt-сигнального каскада, а не Activin/Nodal-или BMP-сигнальных путей, как другие члены этого семейства. Эти выводы проверены и прямыми методами иммунопреципитации, анализа люциферазной активности

репортерных конструкций и наконец по конечным фенотипическим эффектам в различных вариантах суперэкспрессии или подавления экспрессии. При анализе эффектов Noggin4 было показано, что в случае, когда активность в BMP-каскада ингибируется, Noggin4 способен индуцировать полные вторичные оси, включая передний мозг и циклопические глаза, приблизительно у 60% экспериментальных зародышей, т.е. показано, что белок Noggin4 оказывает стимулирующее влияние на развитие головных структур на ранних стадиях развития посредством регуляции механизмов, не связанных с модуляцией активности сигнальных путей BMP и Nodal/Activin.

Важным обнаруженным свойством Noggin4 является нелокальность его физиологического действия и способность к диффузии в межклеточном пространстве клеток зародышей. Эксперименты по пересадке эксплантатов анимальной эктодермы зародышей, экспрессирующих EGFP-Noggin1/2/4, в область крыши бластоцеля зародышей дикого типа и затем анализ распространения метки в помощью конфокальной микроскопии поистине поражают своей технической виртуозностью и уровнем значимости полученного результата. Таким образом, с помощью проведенных экспериментов, и количественной оценки и моделирования автором диссертации убедительно доказано что Noggin4 исполняет роль дальнедействующего ингибитора сигнального пути фактора Wnt8, регулируя передне-задний градиент сигнальной активности каскада Wnt/ $\beta$ -catenin.

Четко и исчерпывающе написана глава «Обсуждение», в которой дан сжатый, но очень емкий по содержанию и значимости анализ полученных автором данных. Выводы основаны на огромном фактическом материале и соответствуют задачам, поставленным диссертантом в работе.

Диссертационная работа А.В. Бородулина является законченным логичным исследованием. Основные результаты диссертации опубликованы в 4 статьях в международных и российских высокорейтинговых рецензируемых журналах, представлены на международной молодежной научной конференции. Автореферат диссертации и опубликованные по теме научные работы полностью соответствуют цели и основным положениям выполненной работы и полностью отражает содержание диссертации.

#### **7. Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.**

В диссертации А.В. Бородулина поставлены масштабные и амбициозные задачи, она неординарна по методическому уровню, полученным результатам и отвечает самым высоким стандартам. Это комплексная и завершенная в рамках поставленных задач работа. Хочется отметить, что диссертация написана хорошим языком, великолепно иллюстрирована высокого качества схемами, рисунками и фотографиями.

В качестве замечаний можно лишь отметить наличие опечаток в тексте диссертации и автореферате, отсутствие во введении диссертации цели задач исследования, которые есть в автореферате, и терминологические жаргонизмы при переводе их с английского языка.

В качестве дискуссии хотелось бы получить от автора ответы на следующие вопросы:

1. При анализе диффузии белка *Noggin4* в межклеточном пространстве клеток зародышей автор делает заключение о дальнодействии и нелокальности его физиологического действия, однако не обсуждается, как влияет устанавливающиеся в ходе дифференцировки эктодермы межклеточные контакты вместе с белками внеклеточного матрикса. Влияют ли они на скорость распространения диффузии этого фактора?
2. При анализе функциональных свойств белка *Noggin4* и способности ингибировать активность **Wnt/ $\beta$ -catenin**-сигнального пути использовали репортерную конструкцию TOPFlash, однако в диссертации не указано, какую репортерную конструкцию использовали в качестве контроля, для исключения неспецифической активации люциферазного репортера.

Высказанные замечания носят редакционный характер и не снижают самого благоприятного впечатления от всей работы.

### Заключение

Таким образом, представленная к защите диссертация Бородулина А.В. выполнена на высоком уровне и достойна самой высокой оценки. Научные результаты и выводы, полученные Бородулиным А.В., являются приоритетными и представляет большой интерес для биологов различных специальностей. Считаю, что диссертация «Секретируемый белок *Noggin4* - новый регулятор активности **Wnt/ $\beta$ -catenin**-сигнального каскада в раннем эмбриональном развитии» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором



исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области молекулярной и клеточной биологии и биологии развития. Диссертация Бородулина Александра Владиславовича соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства 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), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология."

Официальный оппонент  
Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник

О.Ф. Гордеева

Лаборатории клеточных и молекулярных основ гистогенеза  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова  
Российской академии наук  
Адрес: 119991 Москва, ул. Вавилова, д. 26;  
Тел.: (499) 135-87-80;  
E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Подпись Гордеевой О.Ф. заверяю

Ученый секретарь  
Института биологии развития  
им. Н.К. Кольцова РАН, к.б.н.



М.Ю. Хабарова

27 января 2017 г.