

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **Бородулина Александра Владиславовича**
«Секретируемый белок Noggin4 – новый регулятор активности Wnt/ β -catenin-сигнального
каскада в раннем эмбриональном развитии»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.03. – молекулярная биология

Актуальность темы

Формирование передне-задней и спинно-брюшной осей в эмбриональном развитии многоклеточных организмов является критическим этапом закладки плана строения развивающегося организма у позвоночных. Оно находится под контролем ряда сигнальных путей и обеспечивается созданием и поддержанием градиентов секретируемых белков-морфогенов. Корректное соотношение уровней активности морфогенов, их пространственная и временная регуляции должны быть скоординированы между собой с тем, чтобы обеспечить структурные перестройки без нарушения целостности эмбриона. Хотя полярность яиц амфибий задается материнскими факторами, передне-задняя разметка у них, как и у всех позвоночных животных, формируется на стадиях поздней бластулы и в течение гаструляции. Амфибии, прежде всего шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*, являются излюбленными модельными объектами для исследований в области эмбрионального развития. При использовании шпорцевых лягушек выполнены классические экспериментальные исследования, внесшие большой вклад в понимание фундаментальных основ морфогенеза, таких как детерминирование осей и эмбриональная индукция. Работы, в которых изучаются молекулярные механизмы регуляции плана строения позвоночных эукариотических организмов, позволяют выстраивать уточненную картину морфогенеза и, несомненно, являются актуальными.

Научная новизна, обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основной результат работы – открытие функций секретируемого фактора Noggin4 как специфического антагониста сигнального пути Wnt, что критично для формирования головных структур из нейроэктодермы зародышей. Показано, что Noggin4 способен связывать в межклеточном пространстве лиганд Wnt-каскада Wnt8, что конкурентно препятствует его взаимодействию со специфическими мембранными рецепторами и ингибирует трансляцию Wnt-сигналинга внутрь клеток-мишеней. Несомненно, что это – важное открытие, которое расширяет круг известных морфогенов и позволяет проникнуть в особенности молекулярных механизмов регуляции активности канонического Wnt-каскада.

Выяснено, что *Noggin4* не взаимодействует с сигнальными белками путей BMP и Nodal/Activin, в отличие от других представителей семейства *Noggin*, и не влияет на активность этих сигнальных каскадов. В работе впервые проведен сравнительный анализ паттернов экспрессии белка *Noggin4* в зародышах шпорцевой лягушки и птиц. Показан консервативный характер экспрессии гомологов *Noggin4* у разных классов позвоночных, что свидетельствует о физиологической важности функций этого белка. При использовании вновь разработанного метода прижизненной визуализации распределения морфогенов в тканях зародышей лягушки с помощью флюоресцентно-меченных сигнальных белков установлена способность *Noggin4* к быстрому распространению и, таким образом, к дальнедействующим эффектам как ингибитора Wnt-пути. Построена модель регуляции фактором *Noggin4* градиента сигнальной активности *Wnt8* в процессе ранней разметки нервной пластинки у эмбрионов шпорцевой лягушки.

В целом исследование вносит важный вклад в современные представления о морфогенезе позвоночных организмов на молекулярном уровне. Работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит новые экспериментальные данные. Автором выполнен большой объем работы, результаты опубликованы в международных рецензируемых научных журналах. Достоверность полученных результатов, а также обоснованность выводов работы сомнений не вызывает.

Общая оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа А. В. Бородулина построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов, описания материалов и методов, благодарностей, списка использованных сокращений и списка цитированной литературы. Работа изложена на 152 страницах, включает 1 таблицу, 43 рисунка и список литературы, содержащий 379 источников. Основные результаты диссертации опубликованы в 4 статьях в международных и российских рецензируемых журналах из перечня журналов и изданий, утвержденных Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций, и были представлены на XXV Международной зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», (Москва, 11-15 февраля 2013 г).

Экспериментальной части работы предшествует обзор литературы. Обзор, общим объемом в 59 страниц, состоит из четырех крупных частей, что обусловлено необходимостью комплексного осмысления задач, поставленных в работе, а также приложения, содержащего иллюстративный материал. Первая часть обзора посвящена описанию основных участников канонического β -catenin-зависимого Wnt-пути, его лигандов, рецепторов и внутриклеточных факторов, формирующих сигнасомы, структуры,

транслирующие внеклеточную активность Wnt-лигандов в соответствующий уровень внутриклеточного β -catenin. Также в этой части описаны альтернативные ветви Wnt-каскада, не требующие транскрипционной активности β -catenin. Вторая часть посвящена внеклеточной и внутриклеточной регуляции активности Wnt-сигналинга широким набором факторов – как агонистов, так и антагонистов и механизмам их действия. В третьей части рассматриваются различные способы распространения факторов Wnt в тканях, включая создание морфогенных градиентов путем свободной диффузии, использования белков-переносчиков, везикулярного транспорта и специфического цитонемно-опосредованного переноса. Последняя часть обзора посвящена анализу данных литературы о структуре и функциях белков семейства Noggin, включая предварительно опубликованные сведения о Noggin4, функциям которого и посвящена диссертационная работа. В обзоре автором тщательно проанализирован и представлен большой массив данных о роли Wnt-сигналинга в развитии высших эукариот. Некоторым недостатком обзора является отсутствие представленности сведений о других сигнальных путях, взаимодействующих или антагонистических Wnt-пути в онтогенезе. Также впечатление об обзоре могло бы быть улучшено добавлением небольшого заключительного раздела, подытоживающего представленные данные. Но в целом, обзор литературы написан четко, хорошим научным языком, адекватно проиллюстрирован и хорошо подготавливает читателя к восприятию основных результатов диссертационной работы.

Следующий раздел работы «Результаты и обсуждение» имеет общий объем 33 страницы. Основным модельным объектом, используемым в представленной работе, является зародыш шпорцевой лягушки. Но изложение результатов автор начинает с изучения распределения экспрессии белка Noggin4 в раннем развитии кур *G. gallus*, тогда как подобное исследование на зародышах шпорцевой лягушки было выполнено в лаборатории ранее. Необходимость исследования на эмбрионах кур аргументируется тем, что, поскольку потенциально изучаемый фактор вовлечен в регуляцию раннего эмбриогенеза, сравнительная оценка эволюционной консервативности паттернов его распределения представляется важной задачей. Сравнительный анализ данных полученных при помощи гибридизации *in situ* показал, что паттерны экспрессии Noggin4 у зародышей амфибий и птиц достаточно консервативны. По мере прогрессии хорды экспрессия Noggin4 в ней падает до фонового уровня и образует плавный градиент с максимумами в головных структурах и убыванием сигналов в каудальном направлении у обоих видов. Также у обоих видов экспрессия Noggin4 характеризуется диффузностью и сходной локализацией на сопоставимых стадиях развития в материале нейроэктодермы и параксиальной мезодермы (формирующихся сомитов). Автор полагает, что выявленная консервативность

экспрессионных паттернов *Noggin4* у таких эволюционно отдаленных видов позвоночных указывает на функциональную важность белка в раннем индивидуальном развитии.

Далее в процессе выполнения работы автор поставил задачу исследовать влияние *Noggin4* на развитие осевых и головных структур зародышей лягушки. Поскольку было обнаружено, что гомология аминокислотных последовательностей между *Noggin4* и другими представителями семейства *Noggin1* и *Noggin2* невысока, то возникла гипотеза о функциональных отличиях *Noggin4* от белков *Noggin1* и *Noggin2*, которые вовлечены в морфогенетические процессы путем подавления активности сигнального каскада BMP. Автор предположил, что *Noggin4* не вовлечен в индукцию вторичных осевых комплексов зародыша, в отличие от *Noggin1* и *Noggin2*. Действительно, эксперименты по эктопической оверэкспрессии *Noggin4* путем инъекции соответствующей мРНК в зону вентральных бластомеров показали, что *Noggin4* неспособен индуцировать развитие вторичной оси и, по-видимому, не оказывает влияния на активность сигнального пути BMP.

Тем не менее, *Noggin4* влияет на развитие переднеголовных структур зародыша: при эктопически-повышенном уровне его экспрессии наблюдаются увеличение размеров глаз и присоски, тогда как при морфолино-индуцированном нокдауне – обратный эффект. На стадии головастика усиление экспрессии *Noggin4* также приводит к увеличению размеров глаз, а подавление – к уменьшению размеров головы и туловища, недоразвитию головных структур и формированию уменьшенного циклопического глаза. Эти яркие проявления общей антериоризации фенотипа доказывают необходимость корректной экспрессии *Noggin4* в раннем морфогенезе. На основании полученных данных автор предположил, что *Noggin4* может выполнять в раннем развитии функции ингибитора путей *Wnt/β-catenin* и/или *Activin/Nodal*, подавление активности которых также необходимо для развития головных структур. Для проверки данной гипотезы были использованы репортерные конструкции, несущие ген люциферазы под контролем *cis*-регуляторных элементов активируемых компонентами BMP-каскада, *Nodal/Activin*-каскада или *Wnt/β-catenin*-каскада. Такие репортеры были инъецированы в зародыши либо сами по себе (контроль), либо в смеси с мРНК *Noggin1/Noggin2* или мРНК *Noggin4* в возрастающих концентрациях. Полученные результаты показывают, что *Noggin4* не оказывает существенного влияния на люциферазную активность BMP-специфического и *Nodal/Activin*-специфического репортеров, тогда как было выявлено дозо-зависимое влияние *Noggin4* на подавление активности *Wnt/β-catenin*-специфического репортера, активируемого лигандом *Wnt*-пути *Wnt8*, но не *β-catenin* (основным эффектором канонического *Wnt*-каскада). Эти важные результаты позволили автору прийти к выводу, что молекулярные функции *Noggin4* связаны с подавлением *Wnt*-пути и реализуются во внеклеточном пространстве на уровне не ниже взаимодействия *Wnt8* с соответствующим рецептором. Подтверждением полученных результатов явились

эксперименты по ко-иммунопреципитации с Noggin4 эктопически экспрессируемых компонентов сигнальных путей BMP, Nodal/Activin и Wnt, слитых со специфическими тэгами. Noggin4 не взаимодействовал с BMP4, в отличие от своего гомолога Noggin1, и не вызывал снижение концентрации фосфорилированного Smad1, основного эффектора BMP-пути. Noggin4 также не образовывал комплексов с лигандами Nodal/Activin-пути – ActivinB, Xnr2 и Xnr4. Но, как и ожидалось, было показано что Noggin4 способен образовывать комплекс с Wnt8 и конкурировать за это взаимодействие с Frizzled8 – специфическим мембранным рецептором Wnt8, экспрессирующимся в передней нейроэктодерме. Подавление активности Wnt-пути было также подтверждено автором при помощи qRT-PCR прямых генетических мишеней канонического Wnt-каскада Axin2, HoxA1, HoxB1, HoxD1, Siamois и Xnr3. В зародышах, с подавленной экспрессией Noggin4, уровень транскриптов этих генов был найден значительно повышенным и, напротив, сниженным при оверэкспрессии Noggin4. Таким образом, биологическое влияние исследуемого фактора на подавление сигнального пути Wnt у зародышей шпорцевой лягушки было открыто и подтверждено несколькими экспериментальными способами. Экспрессия Noggin4 приводит к подавлению активности классического каскада Wnt, снижению экспрессии его генетических мишеней и проявлению фенотипических эффектов общей антериоризации развивающихся зародышей.

Дальнейшей и весьма сложной задачей, которая была поставлена, явилась оценка сравнительной способности Noggin4 к перемещению в межклеточном пространстве. Для этого были разработаны и проведены весьма элегантные эксперименты. Были получены конструкции, кодирующие секретируемые рекомбинантные белки Noggin1/2/4 и Wnt8, слитые с флюоресцентными метками EGFP или TagRFP. Для оценки диффузионных свойств рекомбинантных белков в межклеточном пространстве была осуществлена пересадка эксплантатов анимальной эктодермы зародышей, экспрессирующих EGFP-Noggin1/2/4, в область крыши бластоцеля зародышей дикого типа и через час после приживания в полученных зародышах измерялось расстояние, которое рекомбинантные флюоресцентные белки из трансплантатов преодолевали в межклеточном пространстве зародышей-реципиентов. Выяснилось, что средний диффузионный путь для EGFP-Noggin4 существенно превосходит таковые значения для EGFP-Noggin1 и EGFP-Noggin2. Данные опытов по восстановлению флюоресценции после выжигания (FRAP) позволили вычислить коэффициенты диффузии для изучаемых белков и показать, что коэффициент диффузии для EGFP-Noggin4 значительно превышает таковой для EGFP-Noggin1 и EGFP-Noggin2. Здесь автором был применен новый экспериментальный подход, заключающийся в измерении времени полувосстановления флюоресценции после фотовыжигания в “одиночном” межклеточном пространстве, что позволило сократить время измерения и предотвратить

необходимость учета побочных процессов. Быстрая диффузия Noggin4, по-видимому, объясняется отсутствием в его последовательности участков связывания с гепарансульфатом, основным протеогликаном внеклеточного матрикса. Наблюдаемые в работе свойства Noggin4 действовать нелокально, то есть не только в области нахождения его мРНК, что проявляется морфологически как билатеральное увеличение присоски при унилатеральной оверэкспрессии Noggin4, также могут обеспечиваться его дальнедействием как морфогена, благодаря высокой диффузионной активности.

В обсуждении результатов автор суммирует полученные данные и интерпретирует их. Автор блестяще справился со всем комплексом поставленных в работе задач. Впервые показано, что Noggin4 функционирует как секретируемый антагонист Wnt/ β -catenin пути в раннем развитии шпорцевой лягушки, регулируя передне-задний градиент сигнальной активности каскада Wnt. Соотнесение полученных результатов с литературными данными позволило автору выдвинуть ряд гипотез о роли Noggin4 в морфогенезе и предложить модель регуляции фактором Noggin4 градиента сигнальной активности Wnt8 в процессе ранней разметки нервной пластинки у эмбрионов шпорцевой лягушки, основанную на экспериментальных результатах и математическом моделировании.

Раздел «Материалы и методы» изложен на 23 страницах и представляет собой подробное описание молекулярных, иммунохимических, эмбриологических и математических методов, а также материалов, штаммов *E.coli* и векторов, используемых автором в настоящей работе. Солидный методический аппарат полностью адекватен поставленным задачам. Четкое и детальное изложение применяемых методов свидетельствует о высокой профессиональной подготовленности Александра Владиславовича, а также о прекрасной методологической базе, используемой коллективом, в котором выполнялась диссертационная работа. Для решения задач выявления функциональной значимости исследуемого белка Noggin 4 был использован широкий и разнообразный набор методов: анализ активности репортерных генов в составе трансгенных конструкций, ПЦР в реальном времени, электрофорез, иммуноферментные методы, ко-иммунопреципитация, гибридизация *in situ*, иммунофлуоресцентные методы с применением конфокальной микроскопии, FRAP.

Замечания по диссертации

Материал диссертации изложен ясно, диссертация четко структурирована и оформлена. Определенными недостатками оформления диссертации являются встречающиеся в тексте ошибки правописания. Обзор данных литературы, имеющий чрезвычайно большой объем, лишен заключения, и практически заканчивается попыткой изложения результатов работы. На рис.14 в разделе «Результаты» ошибки в обозначении белков. Затрудняет прочтение диссертации некоторое несоблюдение последовательного порядка нумерации иллюстраций,

относящихся к разделу «Результаты». Однако это не снижает высокого научного и практического значения диссертации. Представленная работа очень объемна по сложности и многообразию поставленных и разрешенных задач, и заслуживает высоких оценок по заданным автором высоким стандартам доказательной экспериментальной базы и по значимости полученных результатов.

Вопросы и замечания научного характера:

1. В обзоре литературы автор достаточно подробно рассматривает структурные основы взаимодействия белков Noggin с молекулами BMP для подавления их связывания с рецепторами. В работе показано, что Noggin4 не взаимодействует с BMP, но является секретлируемым антагонистом канонического Wnt/ β -catenin сигнального каскада, взаимодействуя с лигандом Wnt8. Но автор почти не обсуждает, какие структурные особенности Noggin4 лежат в основе этого взаимодействия. Функционирует ли Noggin4 как гомодимер? Каков возможный характер конформационных изменений и/или посттрансляционных модификаций у секретлируемой формы белка?
2. Предложенная автором пространственная модель влияния Noggin4 на формирование градиента Wnt8 построена в предположении о свободной диффузии обоих белков. Автор утверждает, что построенная модель пригодна и в случае формирования градиента Wnt8 с помощью цитонемного транспорта в области контактов на реципиентных клетках, обогащенных кластерами LRP6-содержащих сигналом. Можно предположить, что в этом случае, возникает определённая компартментализация и концентрация Wnt8 в локальных участках межклеточных пространств. Учитывая, что аффинность взаимодействия Wnt8 с клеточным рецептором выше, чем с Noggin4, как показано в работе, не следует ли отсюда, что для подавления взаимодействия Wnt8 с рецептором концентрация Noggin4 в местах контактов цитонем, также должна быть существенно выше, чем предполагает модель?

Практическая ценность результатов.

Практическая значимость результатов работы определяется тем, что изученный в работе фактор присутствует и у других позвоночных эукариотических организмов, включая птиц. В работе впервые описана его важная роль в морфогенезе как антагониста Wnt- β -catenin пути, в том числе – в формировании головных структур развивающихся эмбрионов. Таким образом, новый механизм, описанный в работе, может быть универсальным для ряда высших организмов и играть важную роль в их развитии.

Соответствие содержания диссертации указанной специальности.

Диссертационная работа Бородулина Александра Владиславовича «Секретлируемый белок Noggin4 – новый регулятор активности Wnt/ β -catenin-сигнального каскада в раннем эмбриональном развитии», представленная на соискание ученой степени кандидата

биологических наук полностью соответствует специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заключение о соответствии работы требованиям "Положения о присуждении ученых степеней"

Диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно на высоком научном уровне. Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. Таким образом, по актуальности темы, методическому уровню выполнения, новизне и научно-практической значимости полученных результатов диссертация Бородулина Александра Владиславовича «Секретируемый белок Noggin4 – новый регулятор активности Wnt/ β -catenin-сигнального каскада в раннем эмбриональном развитии» полностью соответствует требованиям "Положения 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), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Бородулин Александр Владиславович заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент

кандидат биологических наук,

с.н.с. Лаборатории биохимической генетики животных

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН)



Людмила Владимировна Оленина

Контактные данные:

Адрес: 123182, Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2, ИМГ РАН

Телефон: +7-499-196-08-09 (раб.); 8-916-237-72-30 (моб.)

E-mail: olenina_ludmila@mail.ru

Подпись с.н.с. Л.В. Олениной заверяю:

Учёный секретарь ИМГ РАН

кандидат биологических наук



Людмила Евгеньевна Андреева

8 февраля 2017 г.