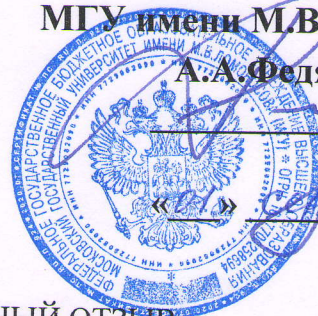


УТВЕРЖДАЮ

Проректор – начальник  
Управления научной политики  
МГУ имени М.В. Ломоносова



А.А. Фелянин

2020 года

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Коротковой Дарьи Дмитриевны на тему «Роль нового белка холонокровных *c-Answer* в регуляции пуриnergического и FGF сигнальных путей при регенерации и в развитии мозга», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Работа посвящена изучению молекулярных и физиологических функций не известного ранее белка - продукта гена *c-answer*, исчезнувшего у теплокровных позвоночных в ходе эволюции, на двух моделях: (1) в процессе развития мозга и (2) при регенерации крупных придатков тела у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, эмбрионы и личинки которой являются классическими моделями для изучения, соответственно, раннего онтогенетического и повторного регенерационного развития у позвоночных.

**Актуальность темы исследования.** Следует отметить, что исследование причин утраты способности к регенерации крупных придатков тела теплокровными животными и прогрессивного развития у них переднего мозга, представляет огромный интерес для фундаментальной науки. Поэтому работа, посвященная изучению генов, вовлеченных в данные процессы у холонокровных позвоночных, чрезвычайно актуальна. Учитывая факт исчезновения *c-answer* у теплокровных и одновременно участия *c-answer* как в регенерации, так и в раннем развитии мозга у холонокровных, изучение механизмов функционирования *c-answer* важно для решения одной из наиболее масштабных проблем эволюционной биологии - выяснения механизмов эволюции способности к регенерации и прогрессивного развития головного мозга у позвоночных. Ген *c-answer* пополнил ряд ранее идентифицированных в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза генов (*agl*, *ras*-

*dva1*, *ras-dva2*, *tfp4*), потеря которых в эволюции могла стать основой для преобразований в молекулярно-генетических механизмах регенерации и развития мозга.

**Научная новизна данной работы**, прежде всего заключается в том, что впервые описан неизвестный ранее ген *c-answer*. Данный ген был обнаружен с помощью биоинформатического метода, разработанного А.Г. Зарайским совместно с коллегами из Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича, направленного на прицельный поиск генов, исчезнувших в ходе эволюции у теплокровных позвоночных, на основании гипотезы о том, что потеря способности к регенерации придатков тела и прогрессивное развитие переднего мозга у теплокровных позвоночных может быть обусловлено потерей некоторых генов в эволюции. В настоящей работе в ходе изучения физиологических и молекулярных функций одного из обнаруженных данным методом генов - *c-answer* **впервые** было показано, что *c-answer* экспрессируется в ходе регенерации хвоста и почки задней конечности головастика, а также в период раннего развития мозга. Было установлено, что участие *c-Answer* в регенерации и развитии мозга шпорцевой лягушки обусловлено его взаимодействием с рецепторами факторов роста фибробластов, FGFRs, и рецептором пуриnergического сигнального пути - P2ry1. **Впервые** показана уникальность молекулярной роли *c-Answer*, являющегося трансмембранным модулятором активности рецепторов различных типов RTK (FGFRs) и GPCR (P2ry1) одновременно. Таким образом, в работе был **впервые** описан открытый, отсутствующий у теплокровных животных, модулятор пуриnergического и FGF сигнальных путей, *c-Answer*, и сформулирована гипотеза об его роли в эволюции позвоночных.

**Значимость результатов для науки и практики.** В ходе работы были получены фундаментальные данные о сигнальных каскадах, регулирующих развитие переднего мозга и ранних этапов процесса регенерации, что вносит существенный вклад в понимание базовых механизмов развития мозга и регенерации крупных придатков тела позвоночных. Исследования функций *c-answer* имеют не только важное фундаментальное значение, но и прикладное, поскольку выявленные сигнальные каскады участвуют не только в процессах ранней эмбриональной индукции и регенерации поврежденных тканей и органов взрослого организма, но и в активации пула стволовых клеток, в процессах онкогенеза. Таким образом, понимание механизмов функционирования *c-answer* может в перспективе стать ключом в лечении ряда заболеваний, связанных с травмами, нейродегенерацией, злокачественными новообразованиями, старением. Полученные в ходе работы данные по взаимодействию *c-Answer* с рецепторами P2ry1 и FGFRs могут быть использованы для биомедицинских исследований, направленных на создание терапевтических подходов к лечению заболеваний, связанных с нарушениями в функционировании P2ry1 и FGFRs

рецепторов. Изучение функционирования *c-Answer*, утраченного в ходе эволюции у теплокровных позвоночных способствует более глубокому пониманию механизмов активации регенерации у позвоночных и выявлению ее ключевых этапов, а также может быть полезно для установления причин потери способности к регенерации конечностей у теплокровных позвоночных, в том числе человека, что может иметь практическую значимость для регенеративной медицины.

Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста и состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, результаты, обсуждение результатов, выводы, материалы и методы. Список литературы включает 117 источников. Работа содержит 31 рисунок. В главе **Обзор литературы** автор анализирует работы по исследованию генетических механизмов эволюционных изменений у позвоночных, механизмы онтогенетического и эволюционного развития переднего мозга позвоночных, молекулярно-генетические механизмы ранних этапов эпиморфной регенерации крупных придатков тела у позвоночных, а также уделяет особое внимание работам, в которых разбираются сигнальные пути, активируемые факторами роста фибробластов и внеклеточными пуриновыми нуклеотидами, как важные регуляторы раннего развития мозга и регенерации. Кроме того, отдельный раздел посвящен особенностям применения технологии CRISPR/CAS9 генного нокаута на модели эмбрионов *Xenopus laevis*. В главе **РЕЗУЛЬТАТЫ** представлены полученные автором данные о первичной структуре белка *c-Answer*, о динамике экспрессии кодирующего его гена в эмбриогенезе и при регенерации конечностей и хвоста личинок шпорцевой лягушки, данные исследования физиологической и молекулярной функции белка в этих процессах, а также по его влиянию на активность FGF- и пуриnergического сигнальных путей. Данные получены автором с использованием современных подходов и методов исследований, таких как: ПЦР в реальном времени, гибридизация *in situ*, инъекции в зародыши лягушки синтетических мРНК и антисмысловых олигонуклеотидов, генный нокаут с помощью системы CRISPR/Cas9, определение активности сигнальных путей с помощью репортерной конструкции на основе люциферазы. Результаты свидетельствуют об успешном решении поставленных задач. **Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.** Следующая глава – **Обсуждение результатов** обосновывает полученные в работе **Выводы**, вытекающие из представленных данных и полностью отражающие результаты проведенных исследований. Материалы и методы изложены четко, полно. В списке литературы представлены все цитируемые работы.

**Рекомендации по использованию результатов диссертации.** Полученные автором данные имеют большую научную ценность для продвижения понимания механизмов

раннего развития мозга и регенерационных морфогенезов у позвоночных и могут быть рекомендованы к использованию в профильных биологических и медико-биологических исследованиях, например, в Федеральном государственном учреждении науки Институте биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Федеральном государственном учреждении науки Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Федеральном государственном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарта Российской академии наук и в других отечественных и зарубежных научных учреждениях.

Принципиальных **замечаний** по диссертации Коротковой Дарьи Дмитриевны нет, но возникли некоторые пожелания по дальнейшему продолжению исследования. Было бы очень интересно для полноты картины проследить активность исследованного белка при частичной утрате регенерационной способности в процессе регенерации конечности в пострефракторный период онтогенеза у шпорцевой лягушки – непосредственно перед метаморфозом и далее, когда возможно только образование покрытой кожей хрящевой спикулы. Что касается некоторых оформительских недочетов, то можно отметить некоторые из них. Хотелось бы список сокращений видеть в начале работы; в главе материалы и методы лучше было бы соединить характеристику объекта и манипуляции с ним, не разбивая изложение описанием других методов; ряд иллюстраций был бы более информативен при более рациональной компоновке и большей четкости в подписи, встречаются погрешности и в списке литературы. И не следует употреблять выражение «экспрессия белков» - экспрессируется ген. Однако, все отмеченные недочеты не снижают общего хорошего впечатления о работе, также, как и отдельные стилистические погрешности не влияют на положительную оценку диссертационной работы.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

На основании изложенного выше можно сделать вывод, что диссертационная работа Коротковой Дарьи Дмитриевны на тему **«Роль нового белка холоднокровных c-Answer в регуляции пуринаргического и FGF сигнальных путей при регенерации и в развитии мозга»** является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для развития исследований в области молекулярной биологии развития, направленных на изучение молекулярных-генетических механизмов и сигнальных каскадов, необходимых для раннего развития конечного мозга и регенерации придатков тела у холоднокровных позвоночных.

Содержание диссертации полно отражено в автореферате.

Данная работа полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемых к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв составлен профессором каф. эмбриологии доктором биологических наук профессором Голиченковым В.А. и ведущим научным сотрудником каф. эмбриологии, к.б.н., ст.н.с. Бурлаковой О.В. Отзыв обсужден и принят на on-line заседании кафедры эмбриологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» 31 августа 2020г. На заседании присутствовали 21 человек из 24 научно-преподавательского состава кафедры. Результаты голосования: «за» – 21 человек, «против» – нет, «воздержался» – нет. Протокол № 7 от 31 августа 2020 г

Заведующий кафедрой эмбриологии  
биологического факультета ФГБОУ ВО  
«Московский государственный университет  
имени М. В. Ломоносова»,  
доктор биологических наук,  
член-корреспондент РАН



А.В.Васильев

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет  
имени М. В. Ломоносова»  
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1  
Тел.: (495) 939-10-00  
Факс: (495) 939-01-26  
E-mail: info@rector.msu.ru