

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Ивановой Анастасии Сергеевны «Роль генов *Agr* и *Ras-dva* в раннем развитии мозга и при регенерации придатков тела у низших позвоночных», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Диссертационная работа Ивановой А.С. посвящена выявлению роли сигнального каскада, включающего гены *Agr* и *Ras-dva1*, в регуляции развития переднего мозга у низших позвоночных, а также в контроле процесса регенерации придатков тела у рыб и амфибий.

Исследования молекулярных сигнальных каскадов, определяющих развитие и функционирование нервной системы, включая и механизмы их регуляции, представляют собой актуальную область экспериментальной биологии. Данная работа посвящена исследованию совершенно нового регуляторного каскада, существование и функциональность которого были впервые показаны диссертантом, что, на мой взгляд, может привести к формированию нового направления исследований в области нейроэмбриологии. Кроме того, диссертантом впервые была показана роль некоторых элементов этого каскада в регуляции процессов регенерации придатков тела у земноводных и рыб. Учитывая отсутствие большинства этих генов в геноме высших позвоночных, данная работа может помочь как пониманию причин снижения их способности к регенерации, так и разработке новых подходов к стимуляции регенеративных процессов в тканях млекопитающих и человека.

Таким образом, тема диссертационной работы Ивановой А.С. является актуальной и обеспечивает основу для дальнейшего изучения молекулярных механизмов раннего развития мозга и регенерации.

Диссертация Ивановой А.С. построена по классической схеме и включает в себя следующие основные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы. Материал диссертации изложен на 126 страницах и содержит 46 рисунков. Список литературы содержит ссылки, как на классические статьи, так и на современные работы. В целом, оформление диссертации соответствует требованиям, установленным Министерством образования Российской

Федерации. Обнаруженные в диссертации немногочисленные опечатки не снижают положительного впечатления от работы.

Раздел «Обзор литературы» состоит из 2х частей. Первая часть посвящена описанию процессов раннего нейрогенеза у эмбрионов шпорцевой лягушки, а также механизмам формирования конечного мозга. Во второй части обзора представлен анализ механизмов регенерации у низших позвоночных, описаны основные этапы этого процесса и молекулярные каскады, контролирующие регенерацию и заживление ран. Обзор написан хорошим языком и представляет собой детальный анализ имеющихся на сегодняшний день данных как по механизмам регуляции формирования конечного мозга, так и по молекулярным аспектам процесса регенерации у низших позвоночных. Литературный обзор характеризуется широким охватом материала и включает данные молекулярно-биологических, эмбриологических и эволюционно-генетических исследований, причём наибольшее внимание уделено самым последним публикациям, характеризующим современное состояние проблемы. На мой взгляд, каждая из двух частей обзора, при некоторой доработке, заслуживает опубликования в отечественной научной периодике.

Раздел «Материалы и методы» дает подробное описание использованных в работе методов. Автор демонстрирует владение широким спектром самых современных методов: метод микроинъекций, гибридизации *in situ*, метод количественного ОТ-ПЦР, флуоресцентная микроскопия, метод получения трансгенных животных и пр. Раздел написан обстоятельно и содержит необходимую информацию для воспроизведения экспериментов.

Раздел «Результаты и обсуждение», содержащий описание экспериментальной работы, выполненной автором, можно условно также разделить на 2 части.

Первая часть посвящена выявлению роли генов *Agr* и *Ras-dva1* в раннем развитии мозга эмбрионов африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. В этом разделе было показано, что малая ГТФаза *Ras-dva1* является ключевым фактором передачи сигнала от фактора *Fgf8*, продуцируемого нервной пластинкой, к клеткам прилегающей ненейральной эктодермы. Для этого использовались как данные гибридизации *in situ*, так и результаты подавления экспрессии гена *Ras-dva1* (использование антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов - МО). Эти эксперименты показали значительное уменьшение экспрессии генов *Agr* и *FoxG1* в

области закола у зародышей *Xenopus*, а также значительные морфологические изменения (уменьшение телэнцефалона и глаз). Сходные результаты (подавление экспрессии генов *Agr*, *Ras-dva1* и *FoxG1*) дало и подавление трансляции мРНК *Fgf8* путем введения морфолиновых антисмысловых олигонуклеотидов. Таким образом, была не только выявлена роль *Ras-dva1* в функционировании *Fgf8*-зависимого каскада, но и показано, что гены *Agr* являются ключевым элементом этого каскада – эффекторами активности *Ras-dva1*. Далее, было подробно исследовано влияние белков *Agr* на экспрессию *FoxG1* – раннего маркера проспективного конечного мозга. Методом гибридизации *in situ* было показано уменьшение области экспрессии генов *FoxG1* и *Fgf8* у зародышей, инъецированных *Xag2* МО. Интересным оказалось то, что экспрессия *Ras-dva1* тоже оказалась подавленной, на основании чего было сделано предположение о наличии регуляторной петли обратной связи между *Ras-dva1* и *Agr*, учитывая подавление экспрессии *Agr* путем инактивации *Ras-dva1*. На следующем этапе работы по этому разделу был выявлен ещё один ключевой элемент *Fgf8*-зависимого регуляторного каскада – транскрипционный фактор *Otx2*. Для этого использовались те же методы, что и в предыдущих экспериментах – оценка паттерна локализации транскрипции гена (гибридизация *in situ*) и подавление активности гена-мишени с использованием МО. Было показано, что области экспрессии генов *Agr*, *Ras-dva1* и *Otx2* в презумптивном теленцефалоне совпадают. Кроме того, эффекты подавления экспрессии *Otx2* оказались схожими с эффектами подавления *Agr* и *Ras-dva1*. Таким образом, было подтверждено участие *Otx2* в *Fgf8*-зависимой сигнальной петле обратной связи между клетками наружной краевой зоны (ANB) и клетками прилегающей передней ненейральной эктодермы. В заключительной части первого раздела, на основании вышеперечисленных результатов представлена модель сигнальной петли обратной связи, согласно которой клетки ANB продуцируют *Fgf8*, который, через активацию *Ras-dva1* и *Otx2*, индуцирует экспрессию *Agrs* в прилегающих клетках ненейральной эктодермы. В свою очередь, белки *Agr*, секретируемые клетками передней ненейральной эктодермы, регулируют развитие конечного мозга посредством стимуляцией экспрессии *Fgf8* в клетках ANB.

Во втором разделе работы проведена оценка потенциальной роли генов *Agr* в регенерации придатков тела низших позвоночных. Для этого, с использованием метода ПЦР в реальном времени была охарактеризована динамика экспрессии генов семейства

Agr (*Xag2*, *Xagr2a*, *Xagr3*) при регенерации хвоста и в почке задней конечности в течение 5 дней после ампутации. При этом ампутация проводилась на двух стадиях развития головастика (стадии 52 и 57), отличающихся по уровню способности головастика к регенерации. Для визуализации экспрессии исследуемых генов непосредственно в живом организме, эти же эксперименты были проведены на трансгенных головастиках, экспрессирующих GFP под контролем промотора гена *Xag2*. Была выявлена резкая активация экспрессии генов *Agr* на 3-й день после ампутации конечности, причём только у головастика на 52-й стадии развития, характеризующейся высокой способностью к регенерации. Сходные результаты были получены и при регенерации хвоста, однако различия между 52-й и 57-й стадиями практически отсутствовали. Активация генов *Agr* в бластеме и прилегающих тканях хвоста была показана и на трансгенных животных, подтверждая, таким образом, роль генов *Agr* в регуляции процесса регенерации придатков тела у земноводных.

Аналогичные эксперименты были проведены и на модели регенерации плавников рыбы *Danio rerio*. Было показано, что ген *Ag1* при развитии *Danio rerio* экспрессируется значительно сильнее и обширнее его ортолога у *Xenopus laevis* и участвует не только в регуляции процесса регенерации плавника, но и в его нормальном росте (развитии). При введении *Ag1*-специфичных МО, было отмечено снижение темпов регенерации плавников и снижение уровня экспрессии специфических маркёров регенерации - генов *Fgf20a* и *Igf2b*.

На завершающем этапе этого раздела работ, автором была проведена оценка участия генов *Ras-dva* в регенерации придатков тела низших позвоночных. Методом гибридизации *in situ* было показано, что *Ras-dva1* активируется в раневом эпителии, а так же в клетках бластемы и ното хорда, в то время как транскрипты *Ras-dva2* детектируются исключительно в клетках бластемы, причём индуцируются оба этих гена очень быстро (в первый день после повреждения) и уже на вторые сутки их экспрессия резко падает. Таким образом, сделан вывод о вовлеченности этих генов в контроль раннего этапа заживления раны и формирования бластемы. При подавлении экспрессии этих генов с использованием соответствующих МО было выявлено отсутствие дорсального/вентрального или обоих плавников, а так же значительное замедление или отсутствие регенерации. Эктопическая экспрессия генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2* вела к восстановлению способности к регенерации у головастика *Xenopus*.

Таким образом, в ходе выполнения данной работы автором был выявлен новый регуляторный каскад, контролирующий взаимодействие клеток наружной краевой зоны и прилегающей ненейральной эктодермы и, таким образом, влияющий на развитие переднего мозга у низших позвоночных. Так же были охарактеризованы отдельные элементы этого каскада, их взаимодействие и роль в регуляции процесса регенерации придатков тела низших позвоночных.

В целом, работа выполнена на самом высоком международном уровне. Вместе с тем, как и к любой другой работе, к представленному на защиту исследованию есть некоторые замечания. Практически все они являются незначительными и чисто редакционными и, таким образом, не влияют ни на значимость экспериментов, ни на выводы работы.

В частности:

1. Не указаны единицы масштаба на рисунке 1.

2. Фраза «Таким образом, можно говорить о том, что для развития теленцефалона необходима коэкспрессия генов *Ras-dva1* и *FoxG1* в двух различных зонах» представляется не совсем обоснованной. *In situ* гибридизация не является количественным методом и даёт представление только о локализации транскрипции, но не о её функциональной значимости. Подобное заключение должно быть подтверждено функциональным экспериментом (оценкой взаимодействия белковых продуктов).

3. Окончание фразы «В целом, уровень экспрессии гена *Xagr3* был ниже по сравнению с другими генами, т.е. сигнал в ПЦР-амплификаторе фиксируется на более поздних циклах» (стр.82) лучше было бы заменить на: «сигнал был ниже относительно контрольного гена».

4. Фраза «Полученные данные можно объяснить следующим образом: если ген экспрессируется на высоком базовом уровне, то при повреждении его транскрипты немедленно расходуются на регенерацию, вследствие чего сначала уровень экспрессии гена снижается, а затем возрастает до базового уровня» (стр.93) не совсем корректна. Здесь нужно говорить не о снижении уровня экспрессии, а о снижении уровня транскриптов.

5. Фраза «*Vivo*-морфолино – синтетические морфолиновые олигонуклеотиды, способные проникать в клетку благодаря остатку окта-гуанидин дендримера и

подавлять трансляцию целевой мРНК путем связывания с областью инициации трансляции” (стр.96-97) описывает один из основных методов исследований, поэтому её было бы логичнее использовать гораздо раньше по тексту, при первом упоминании этого метода.

Из значимых замечаний можно отметить только одно: несколько недостаточную обоснованность логической (смысловой) связи между двумя частями работы – 1) исследованием регуляторного каскада, контролирующего обмен сигналами между клетками нервной пластинки и прилегающей ненейральной эктодермы и 2) оценкой роли некоторых элементов этого каскада в регенерации придатков тела. Существование этой логической связи затронуто очень кратко во введении и в обзоре литературы, однако вопрос, каким образом результаты первой и второй части работы дополняют друг друга, каково их взаимное значение (которое, на мой взгляд, велико) оставлен без должного внимания. Единственное, что логически объединяет две части работы – это гипотеза, высказанная в последнем пункте выводов. Несмотря на то, что она представляет большой интерес, к сожалению, в тексте диссертации она не обсуждается.

Тем не менее, этот недостаток никак не влияет на высочайший методологический уровень данной работы и её несомненную информативную значимость как для нейроэмбриологии, так и для регенеративной биологии. На мой взгляд, представленная работа является прекрасным примером классического эмбриологического исследования, последовательно и обстоятельно раскрывающего тонкие механизмы регуляции процессов развития и регенерации.

Таким образом, на основе изучения диссертации и опубликованных работ по теме диссертации, я могу заключить, что диссертационная работа Ивановой А.С. актуальна по своим задачам и содержанию, и является логически завершенным исследованием, выполненным на самом современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы получены впервые, непосредственно диссертантом, и опубликованы в ведущих рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень журналов и изданий, утвержденных Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов сомнений не вызывает.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нем правильно отражены основные идеи и выводы диссертации, новизна и практическая значимость результатов исследований.

Все вышеизложенное позволяет мне заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения и научной значимости диссертационная работа Ивановой Анастасии Сергеевны «Роль генов Agr и Ras-dva в раннем развитии мозга и при регенерации придатков тела у низших позвоночных» 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), а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. – молекулярная биология.

Официальный оппонент,
кандидат биологических наук,
начальник лаборатории тканевой инженерии
НИЦ «Курчатовский Институт»
Пантелеев Андрей Александрович

А.А. Пантелеев

Адрес: 23182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.
Телефон: +7 (499) 196-95-39
E-mail: a.a.pantel@gmail.com

Подпись к.б.н. Пантелеева Андрея Александровича
заверяю:

Главный Ученый секретарь
НИЦ «Курчатовский Институт»



С.Ю. Стремоухов