

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 29 июня 2022 г. № 17

О присуждении **Паршиной Елене Анатольевне** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Роль зиксина, белка фокальной адгезии, в регуляции уровня транскриптов генов-маркеров стволовых клеток» по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология принята к защите 27 апреля 2022 г. (протокол заседания №11) Диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Паршина Елена Анатольевна, 16 мая 1994 года рождения. В 2018 г. окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по специальности Биология, специализации Эмбриология. С 2018 по 2022 гг. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). Справка о сдаче кандидатских экзаменов получена в 2022 году в ИБХ РАН. В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН.

Научный руководитель - кандидат биологических наук Мартынова Наталья Юрьевна, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Шидловский Юлий Валерьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук, и Лябин Дмитрий Николаевич, кандидат

биологических наук, руководитель группы регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном д.б.н., чл.-корр. РАН, заведующим кафедрой эмбриологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова Васильевым Андреем Валентиновичем и утвержденном проректором – начальником Управления научной политики МГУ имени М.В.Ломоносова д.ф.-м.н. Федяниным Андреем Анатольевичем, указала, что диссертация Паршиной Елены Анатольевны является завершенной научно-квалификационной работой и полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 10 опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 8 работ общим объемом 10 печ.л. в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Е.А. Паршина внесла основной либо существенный вклад, включают:

- 1) Martynova N.Y., **Parshina E.A.**, Zraisky A.G. Cytoskeletal protein Zyxin in embryonic development: from controlling cell movements and pluripotency to regulating embryonic patterning // *FEBS J.* 2022. DOI: 10.1111/febs.16308.
- 2) Martynova N.Y., **Parshina E.A.**, Zraisky A.G. Using RNA-binding proteins for immunoprecipitation of mRNAs from *Xenopus laevis* embryos // *STAR Protocols.* 2021. V. 2(2). P. 100552. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100552.
- 3) Martynova N.Y., **Parshina E.A.**, Zraisky A.G. Protocol for separation of the nuclear and the cytoplasmic fractions of *Xenopus laevis* embryonic cells for studying proteins shuttling // *STAR Protocols.* 2021. V. 2(2). P. 100449. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100449.
- 4) **Parshina Elena A.**, Eroshkin Fedor M., Orlov Eugeny E., Gyoeva Fatima K., Shokhina Arina G., Staroverov Dmitry B., Belousov Vsevolod V., Zhigalova Nadezhda A., Prokhortchouk Egor B., Zraisky Andrey G., Martynova Natalia Y. Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits the Activity of Genes Responsible for Embryonic Stem Cell Status // *Cell Reports.* 2020. V. 33(7). p. 108396. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108396.
- 5) **Паршина Е. А.**, Зарайский А. Г., Мартынова Н. Ю. Роль материнского гена *rou5f3.3/oct60* в регуляции начальных этапов дифференцировки тканей в эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* // *Биоорганическая химия.* 2020. Т. 46, № 6, с. 719–728. DOI: 10.2139/ssrn.3554017.
- 6) Мартынова Н.Ю., **Паршина Е.А.**, Ерошкин Ф.М., Зарайский А.Г.

Цитоскелетный белок зиксин модулирует экспрессию генов-мишеней *shh* сигнального каскада в клетках нервной пластинки эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* // *Биоорганическая химия*. 2020. Т. 46, № 4, с. 396-403. DOI: 10.31857/S013234232004020X.

- 7) Tereshina Maria B., Ivanova Anastasiya S., Eroshkin Fedor M., Korotkova Daria D., Nesterenko Alexey M., Bayramov Andrey V., Solovieva Elena A., **Parshina Elena A.**, Orlov Eugeny E., Martynova Natalia Y., Zraisky Andrey G. *Agr2* - interacting *Prod1* - like protein *Tfp4* from *Xenopus laevis* is necessary for early forebrain and eye development as well as for the tadpole appendage regeneration // *Genesis*. 2019. V. 57, № 5, p. e23293. DOI: 10.1002/dvg.23293.
- 8) Martynova N.Y., **Parshina E.A.**, Ermolina L.V., Zraisky A.G. The cytoskeletal protein *Zyxin* interacts with the zinc-finger transcription factor *Zic1* and plays the role of a scaffold for *Gli1* and *Zic1* interactions during early development of *Xenopus laevis* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018. V. 504, № 1, pp. 251-256. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.164.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.б.н., профессора РАН Шидловского Юлия Валерьевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- 1) Интересно, что при оверэкспрессии *zyxin* количество транскриптов *rou5f3* уменьшалось лишь в два раза, в то время как при нокдауне *zyxin* в опытных образцах количество мРНК увеличивалось на порядок. Чем можно объяснить такой незначительный эффект от оверэксперссии *zyxin*?
- 2) Предпринимались ли попытки изучить влияние нокдауна *zyxin* на работу эндогенного промотора гена *rou5f3.3*? Это можно было бы сделать, измерив уровень РНК-полимеразы на промоторе в хроматин-иммунопреципитации или несплайсированного транскрипта этого гена.

2. Отзыв официального оппонента к.б.н. Лябина Дмитрия Николаевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

*Общие замечания*

В тексте работы имеют место неточные формулировки, смысловые и стилистические погрешности, встречаются жаргонизмы и англицизмы. В ряде графиков отсутствуют данные о статистической значимости наблюдаемых изменений.

*Замечания к разделу «Обзор литературы»*

- 1) Как можно объяснить, что со стадии 35-36 уровень экспрессии *rou5f3.3* возрастает (рисунке 6). Кроме того, в обзоре не хватает отдельной главы по эмбриональному развитию *Xenopus laevis*.
- 2) В обзоре литературы стоило упомянуть о белке FRGY2, как мажорном компоненте мРНК ооцитов *Xenopus*. К тому же на стр. 25 за сайт связывания YB-1 выдается сайт связывания FRGY2 (YRS-последовательность).
- 3) YB-1 был идентифицирован как транскрипционный фактор в 1988 году, а не в 1970-х (как указано на стр. 23).

- 4) Отсутствует описание одного важного факта участия YB-1 в эмбриональном развитии. В частности, не упомянута работа Yang et al., 2019 о роли YB-1 в стабилизации мРНК в эмбриональном развитии *Danio rerio*.

Замечания к разделу «Материалы и методы»

- 1) В главе 3.2.1. «Манипуляции с эмбрионами *Xenopus laevis* и *Danio rerio*» описана очень скупо – в отношении эмбрионов *Xenopus laevis* только ссылка на публикацию.

Замечания к разделу «Результаты»

- 1) В работе не приводятся данные вестерн-блотов, показывающие снижение количества белка Zuxin при нокдауне с помощью MO.
- 2) Однозначно утверждать об отсутствии эффекта YB-1 на транскрипцию *pou5f3* не стоит. Изучение активности промотора *pou5f3.3* говорит об отсутствии такого эффекта (рис. 28), однако эксперимент с актиномицином D не был проведен.
- 3) Почему в опытах по анализу распределения YB-1 и Zuxin (рис. 24) использовали инъекцию эмбрионов мРНК *btus-ybx1*, а не проверяли распределение эндогенного YB-1? Как экспрессируется ген YB-1 в процессе эмбрионального развития *Xenopus laevis*; изменяется ли количество YB-1 при нокдауне *zuxin*?
- 4) В опытах с лептомицином В нужен контроль на локализацию белков YB-1 и Zuxin.
- 5) Трудно сказать, что вклад Ybx1 в увеличение количества транскриптов *vent2.1* и *vent2.2* при нокдауне *zuxin* «маловероятен», так как не было проанализировано изменение уровня транскриптов *vent2.1* и *vent2.2* и др. при оверэкспрессии YB-1.
- 6) Судя по рисунку 32, уровень мРНК *zuxin* падает при оверэкспрессии *pou5f3.3*, что предполагает регуляторный механизм с обратной связью. Это практически никак не обсуждается в работе.
- 7) На рисунке 33 справа не хватает данных об изменении экспрессии *nanog* при нокдауне *zuxin* на более ранних стадиях нормального развития зародыша.

Замечания к разделу «Выводы»

- 1) В пункте 3, возможно, не хватает выражения «при подавлении экспрессии *zuxin*».

**3.** Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Принципиальных замечаний по диссертации нет. Несколько стилистических неточностей не умаляют ценности диссертационной работы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии и биологии развития, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. Тематика работ официального оппонента Шидловского Ю.В. связана с выяснением молекулярных механизмов, регулирующих экспрессию генов, в контексте различных процессов на уровне организма, в том числе в эмбриогенезе. Официальный оппонент Лябин Д.Н. является ведущим специалистом в области исследования Ybx1

белка. Коллектив ведущей организации занимается вопросами регуляции эмбрионального развития, работа проводится в том числе на модели холоднокровных позвоночных. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований был впервые описан не известный ранее механизм, с помощью которого цитоскелетный белок *Zuxin* может влиять на стабильность мРНК генов плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток: *Oct4/Pou5f3*, *Klf4* и *NANOG/Vent*. Универсальность данного механизма была продемонстрирована на трех экспериментальных моделях: на эмбрионах шпорцевой лягушки, на эмбрионах рыбы данио, а также на иммортализованных клетках эмбриональной почки человека линии HEK293.

Теоретическая значимость исследования состоит в углублении знаний о механизмах, отвечающих за согласование процессов эмбрионального развития. Результаты, полученные в работе, являются базой для дальнейших исследований молекулярных механизмов взаимной регуляции процессов морфогенеза, а также канцерогенеза, в которых *Zuxin* принимает участие как белок межклеточных контактов, и дифференцировкой тканей, которая напрямую регулируется генами плюрипотентности.

Уникальные и неожиданные результаты о регуляции экспрессии генов плюрипотентности вследствие изменения морфогенетического статуса клеток имеют большое практическое значение. *Zuxin* является известными онкомаркером, нарушение его функционирования приводит к росту и метастазированию широкого спектра злокачественных новообразований. Поэтому исследование его роли в регуляции дифференцировки клеток может иметь большое значение для биомедицины.

Достоверность результатов исследования сомнений не вызывает: исследования проводились с использованием современных научных методов, экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов неоднократно продемонстрирована, при анализе данных были использованы современные методы сбора и обработки информации.

Все эксперименты по получению эмбрионов *Xenopus laevis*, ОТ-ПЦР, *in situ* гибридизации, получению антител к *Pou5f3.3*, созданию генетических конструкций, исследованию активности люциферазных репортеров, РНК- и ко-иммунопреципитации проведены лично Паршиной Е.А. Эксперименты с *Danio rerio* и клетками человека проведены автором совместно с сотрудниками лаборатории молекулярных технологий ИБХ РАН и сотрудниками Института белка РАН, соответственно. Обработка и интерпретация полученных данных, а также подготовка материалов научных публикаций

также проводилась с активным участием Е.А. Паршиной.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Паршиной Е.А. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят важный вклад в развитие молекулярной биологии и биологии развития. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом диссертационная работа Паршиной Елены Анатольевны «Роль зиксина, белка фокальной адгезии, в регуляции уровня транскриптов генов-маркеров стволовых клеток», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

- 1) Какова структура Zyxin? Это водорастворимый белок? Как он проникает через мембрану ядра?
- 2) Чем Zyxin интересен для онкологии?

Соискатель Паршина Е.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

- 1) У Zyxin есть несколько функциональных частей. N-часть – пролин-богатая, она связывается с белками, которые связываются с актином, например белки Ena/VASP. C-конец содержит LIM-домены. LIM-домены могут связывать ДНК, но для Zyxin показано только в одной работе, что он может ими связывать ДНК, а в основном во всех работах и в нашей лаборатории показано, что он взаимодействует своими LIM-доменами с другими белками. И было показано, что он взаимодействует с рядом транскрипционных факторов и это имеют функциональную значимость для экспрессии ряда генов. И у него так же есть сигнал экспорта из ядра, который позволяет ему перемещаться из ядра в цитоплазму. Поскольку у него нет NLS, сам он в ядро ходить не может и ходит с другими белками. Это водорастворимый белок, и он проникает через мембрану ядра с другими белками.
- 2) Zyxin является маркером клеточных перерождений. Причем в разных типах рака он по-разному себя ведет: для ряда раков, когда его экспрессия уменьшается, он является маркером перерождений, а для некоторых типов рака – наоборот, негативным сигналом является увеличение его количества. И когда его количество уменьшается, клетки теряют сродство друг с другом и могут мигрировать. В частности, когда метастазирование происходит, белка Zyxin в клетках становится меньше.

