

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Глушанковой Наталии Александровны
на диссертационную работу Мартыновой Натальи Юрьевны
«Белковые комплексы с участием цитоскелетного белка зиксина в процессах
эмбриональной дифференцировки и морфогенеза»,
представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук
по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

Актуальность темы исследования

Диссертация Натальи Юрьевны Мартыновой высоко актуальна прежде всего потому, что объект изучения данной работы, зиксин, является важнейшим цитоскелетным белком. Он входит в состав фокальных контактов, структур, которые определяют не только прикрепление клеток внеклеточному матриксу, но и их способность к мезенхимальной миграции. На ранних этапах эпителиально-мезенхимального перехода – программы, инициирующей в опухолях инвазионно-метастатический каскад, зиксин вовлечен в разборку и реорганизацию межклеточных адгезионных контактов, что приводит к ослаблению межклеточной адгезии. Зиксин, являясь механотрансдуктором, из фокальных контактов перемещается на актиновые стресс-фибриллы, а при спонтанных разрывах способствует их репарации, привлекая VASP. Зиксин интегрирует сигналы от цитоскелетных и адгезионных белков, в частности через Hippo и TGF β -сигналинг. Зиксин – один из тех белков, которые совершают ядерно цитоплазматические перемещения. Три LIM домена С-концевой области взаимодействуют с широким спектром структурных, регуляторных и сигнальных белков, влияющих на фундаментальные клеточные процессы. Вместе с тем подавляющее большинство данных по зиксину получены на клеточных культурах, часто на опухолевых клеточных линиях, поэтому работа Н.Ю. Мартыновой на эмбрионах *Xenopus laevis*, посвященная исследованию роли зиксина как важного сигнального хаба в эмбриональном развитии, безусловно актуальна. Эта работа важна также и потому, что она описывает пусковые механизмы клеточной дифференцировки и механизмы, лежащие в основе важнейших событий раннего эмбриогенеза.

Целью диссертационной работы Н.Ю. Мартыновой было изучение механизмов, связывающих морфогенез и экспрессию генов в ходе эмбрионального

развития на примере многофункционального цитоскелетного белка зиксина, а основной задачей – исследование функций зиксина и его комплексов в регуляции раннего развития позвоночных.

Структура и объём диссертации

Диссертация Н.Ю. Мартыновой представляет собой фундаментальный труд, изложенный на 402 страницах. Работа иллюстрирована 82 рисунками, 8 таблицами и 5 приложениями. Библиография включает 449 источников, в том числе публикации самых последних лет. Диссертационная работа построена по традиционному плану, включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Результаты», «Обсуждение», «Материалы и методы», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и пять приложений.

Во Введении диссертации приводятся убедительные доказательства актуальности выполненного исследования, его новизны, теоретической и практической значимости. Четко сформулирована цель и четыре задачи исследования, положения, выносимые на защиту. Приведены сведения об апробации и список публикаций – 48 статей по тематике исследования в рецензируемых журналах, начиная с 2008 года.

Обзор литературы состоит из 12 подразделов. В Обзоре литературы последовательно описано молекулярное строение зиксина, его посттрансляционные модификации, эволюционно консервативное семейство зиксин-подобных белков, спектр белковых партнёров, роль зиксина в клеточной адгезии и миграции, передаче сигналов, регуляции актинового цитоскелета, механотрансдукции. Рассматривается участие зиксина в патогенезе сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний человека, его вовлеченность в развитие фиброзных патологий, макротромбоцитопении. Приведены имеющиеся на данный момент немногочисленные данные об участии зиксина в эмбриогенезе, подробно рассмотрена ключевая роль транскрипционного фактора *Anf* как регулятора развития переднего мозга, сигнального каскада *Hedgehog*, значимого для формирования дорсо-вентральной организации нервной трубки, описаны факторы плюрипотентности семейства *PouV*. Обзор литературы хорошо написан, очень подробный, систематизирует основные значимые данные, связанные с

многофункциональной ролью зиксина. Следует отметить, что в Обзоре литературы четко прослеживается связь между литературными данными и задачами собственного исследования Н.Ю. Мартыновой.

Раздел Результаты изложен на 130 страницах и включает 12 подразделов. Он начинается с описания экспериментов по поиску партнеров мастер-регулятора формирования переднего мозга *Xanf1* у *X. laevis* с использованием дрожжевого двугибридного скрининга, в котором среди нескольких других партнеров была идентифицирована последовательность, кодирующая LIM-доменную часть зиксина, после чего была клонирована его полноразмерная кДНК. Биоинформатический анализ показал высокую степень гомологии зиксина шпорцевой лягушки с зиксином человека и курицы. Автор последовательно и полно описывает подходы, использованные в работе для выяснения функциональной значимости зиксина на этапах раннего эмбриогенеза. С использованием ОТ-ПЦР и гибридизации *in situ* на целых зародышах с антисмысловым зондом к мРНК зиксина выявлено резкое увеличение экспрессии зиксина во время гастрюляции. В период завершения гастрюляции и начала нейруляции наблюдалось значительное повышение экспрессии зиксина в клетках краниальной эктодермы и в области формирующейся нервной пластинки. В ходе дальнейшей нейруляции экспрессия зиксина нарастала в переднем отделе нервной пластинки. Автор исследования делает вывод о вовлеченности зиксина в морфогенез головного мозга.

Для исследования взаимодействия зиксина и *Xanf1* были сконструированы гибридные конструкции С-концевой области зиксина, слитые с FLAG, и *Xanf1*, слитого с Мус, которые микроинъектировали в зародыши *X. laevis* на стадии 2-4 бластомеров. На стадии ранней нейрулы с использованием дрожжевого двугибридного скрининга, pull-down assay и коиммунопреципитации, было показано, что LIM2 домен зиксина связывается с EN1 доменом транскрипционного фактора *Xanf1*.

При анализе кДНК-библиотеки эмбрионов на стадии 10–12 среди нескольких партнеров LIM-доменов зиксина-были идентифицированы три белка сигнального пути Hedgehog, играющего ключевую роль в регуляции клеточной дифференцировки в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития. С помощью нескольких подходов было обнаружено, что зиксин *X. laevis*

взаимодействует с транскрипционными факторами Zic1 и Gli1 и может образовывать тройной комплекс. С использованием репртерных конструкций показано, что зиксин угнетает транскрипционную активность Gli1. Также показано, что экспрессия экзогенных конструкций Zic1 и Zic-Gli1 увеличивала представленность зиксина в ядрах. Изучено влияние зиксина на экспрессию генов-мишеней сигнального пути Hedgehog, оказалось, что зиксин является негативным регулятором этого сигналинга.

Несколько подразделов работы посвящены исследованиям, доказывающим влияние зиксина на регуляторную роль Ybx1 в поддержании стабильности мРНК, в частности, факторов плюрипотентности семейства pou5f3. Подавление экспрессии зиксина приводило к повышению экспрессии Pou5F3.3, что показано как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Отдельная глава посвящена поиску на стадии нейрулы транскриптов, ассоциированных с фактором Ybx1, чья стабильность изменяется при нокдауне зиксина, в этой части работы был использован метод рибоиммунопреципитации с последующим секвенированием (RIP-seq). Результатом тщательно спланированного и проведенного исследования явилась идентификация четырех генов *crx* (*otx5*), *cer1*, *foxp3* и *mix1*, стабильность мРНК которых регулируется Ybx1 и зиксином. Идентифицированные гены кодируют компоненты головного организатора эмбриона. Также в отдельной главе изложены результаты исследования участия зиксина в ретиноидной сигнализации. Заключительная глава Результаты посвящена протеомному анализу интерактома зиксина на ключевых стадиях раннего эмбриогенеза *X.laevis*. Было показано, что на всех стадиях зиксин перманентно взаимодействует с актином, цитоскелетными белками фокальных контактов винкулином и талином и регулятором полимеризации актина VASP. От стадии 10 к стадии 16 обнаружено прогрессивное увеличение ассоциации с зиксином немышечного миозина II и актинина, входящих в состав акто-миозиновых пучков и определяющих морфогенетические процессы нейруляции. Динамический характер: также носит взаимодействие зиксина с Ybx1 с пиком на стадии 14, и с Gli1 с максимумом на стадии 16 в процессе дорсо-вентральной разметки нервной трубки.

В Обсуждении собственные данные автора не только проанализированы, но и сопоставлены с данными других авторов. Обсуждение подтверждает высокий теоретический уровень диссертантки.

Материалы и методы прописаны чрезвычайно подробно, их набор впечатляет. В работе использованы методы и подходы, дополняющие друг друга, в том числе дрожжевой двугибридный скрининг, РНК-иммунопреципитация, pull-down assay, EMSA, RIP-seq и RNA-seq, количественная масс-спектрометрия. Разработаны и использованы люциферазные репортеры. Для нокаута белков применялось CRISPR/Cas9-редактирование. Ключевые результаты подтверждены на двух дополнительных моделях (на эмбрионах *Danio rerio*, и на линии клеток человека HEK293. Подробное описание использованных методов обеспечивает полную воспроизводимость всех описанных экспериментов, что является важным достоинством диссертации.

Закключение диссертации подводит итог большой многогранной работы. В нем сформулированы семь выводов, которые полностью отражают содержание работы.

Научная новизна, достоверность и значимость результатов

Диссертационная работа Н.Ю. Мартыновой является большим фундаментальным исследованием, при выполнении которого получено значительное количество новых важных данных. Впервые был клонирован и охарактеризован ген зиксина у *X. laevis*, показана его гомология с зиксином человека и курицы, описаны посттрансляционные модификации белка. Впервые описана аккумуляция зиксина в переднем отделе нервной пластинки эмбрионов *X. laevis*. Впервые показано, что посредством LIM2 домена зиксин взаимодействует с транскрипционным репрессором χ Anf1, ослабляя его активность, что влияет на морфогенез переднего мозга. Впервые обнаружено связывание зиксина с ключевыми компонентами сигнального пути Hedgehog с формированием тройного ядерного комплекса с транскрипционными факторами Zic1 и Gli1, при этом зиксин подавляет транскрипционную активность Gli1, блокируя его связывание с ДНК. В работе Н.Ю. Мартыновой доказано, что зиксин является негативным регулятором Shh-сигналинга, *in vivo* влияя на установление границ экспрессии соответствующих генов -мишеней. Идентифицирован новый молекулярный механизм регуляции со стороны зиксина за счет связывания с YBX1 и угнетения посттранскрипционного механизма контроля стабильности мРНК. Впервые показано, что, используя этот механизм, зиксин негативно регулирует экспрессию ключевых регуляторов

плюрипотентности – белков семейства *pou5f3* и рецептора ретиноевой кислоты *rxrg*, что способствует их деградации. С использованием нескольких экспериментальных подходов установлено, что зиксин является негативным регулятором программы плюрипотентности. На эмбрионах *Danio rerio* и в клетках человека HEK293 показано, что супрессия зиксина активирует гены плюрипотентности *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и *Klf4*. С использованием RIP-seq доказано, что на стадии нейрулы реализуется посттранскрипционный механизм регуляции зиготических генов-мишеней *crx* (*otx5*), *cer1*, *foxn3*, *mix1* с участием комплекса Ybx1 и зиксина. В работе Н.Ю. Мартыновой впервые проведен масс-спектрометрический анализ интерактома зиксина на ключевых стадиях раннего эмбриогенеза *X. laevis*.

Достоверность экспериментальных данных, полученных Н.Ю. Мартыновой, не вызывает сомнений, так все исследования включают необходимые контроли, статистически обработаны. В работе использован широкий круг самых современных методов молекулярной биологии, позволивших автору получить четкие достоверные результаты и сделать обоснованные выводы. Достоверность полученных результатов подтверждается публикациями в рецензируемых международных научных журналах с высоким импакт-фактором. Результаты работы неоднократно докладывались и обсуждались на российских и международных конференциях и симпозиумах.

Значимость работы для биологии развития очень высока. Впервые исследовано значение механотрансдуктора зиксина для регуляции раннего развития позвоночных. В диссертационной работе Н.Ю. Мартыновой доказано, что цитоскелетный белок может выступать интегратором не только механических сигналов, но и сигнальных путей (Hedgehog, ретиноевой кислоты) и посттранскрипционного контроля. Практическая значимость работы заключается в том, что выявленные белковые взаимодействия (зиксин–Ybx1, зиксин–Gli1, зиксин–Xanf1) представляют собой потенциальные мишени для модуляции клеточной пластичности в регенеративной медицине и онкологии. Созданные генетические конструкции и протоколы могут быть использованы в лабораториях биологии развития и молекулярной онкологии.

Диссертационная работа написана хорошим литературным языком, отражает высокий теоретический и экспериментальный уровень диссертантки, ее личный

вклад, четкость в понимании и интерпретации полученных результатов. Особенностью диссертационной работы является логичность изложения материала, отражающая последовательные этапы исследования, следующего от фиксации полученных результатов к прояснению механизмов установленных взаимосвязей. Логика экспериментов, направленных на выяснение взаимодействия зиксина с тем или иным белком, подробно объясняется. В разделе Результаты представлено значительное количество иллюстраций, подтверждающих факты, установленные диссертанткой. Автор непосредственно участвовала во всех этапах исследования, включая подготовку публикаций. Экспериментальные данные, использованные в диссертационной работе, получены автором лично.

Вопросы и замечания по диссертации

Замечаний к диссертации совсем немного.

1. На рисунке 36, иллюстрирующем перераспределение зиксина и Gli1 при совместном введении в фибробласты, правильнее было бы показать не единичные клетки, а несколько клеток культуры, а в Материалах и Методах более подробно описать измеряемые показатели. При анализе флуоресценции важно, чтобы выдержки были одинаковы и не было пересвета, что существенно влияет на показатели интенсивности флуоресценции.
2. На рисунке 37, где показано влияние зиксина на транскрипционную активность Gli1 с использованием репортерной конструкции хотелось бы также видеть, как влияет на репортерную активность зиксин с мутацией в Lim2 домене.
3. В главе 2.12.1 на рисунке 75 также хотелось бы видеть ссылку на первичные экспериментальные данные масс-спектрометрического анализа.

Вопросы

1. Исследовали ли влияние зиксина на Hippo signaling, как один важных сигнальных путей механосенсинга.
2. На Рис. 44 видно, что по данным NGS при нокдауне зиксина наряду с изменением экспрессии, генов, регулируемых Shh сигналингом, снижается экспрессия генов механотрансдукторных сигнальных путей, при этом активируется TGF β сигнальный путь. Что Вы думаете о возможных механизмах

механотрансдукторного сигналинга на стадии нейрулы, так как очевидно, что супрессия зиксина влияет на морфогенетические движения?

3. Как вы объясняете расхождения в трактовке значимости зиксина в эмбриональном развитии, в том числе при формировании переднего мозга, с работой группы Beckerle на нокаутных по зиксину мышах, развитие которых, и формирование ЦНС в частности, не отличалось от контрольных мышей (Hoffman et al., 2003).

Замечания и вопросы носят рекомендательный характер и не касаются существа диссертационного исследования. Диссертационная работа надлежащим образом оформлена, не содержит фактических ошибок, имеет некоторое количество опечаток, которые никоим образом не влияют на ее качество.

Заключение

Диссертационная работа Н.Ю. Мартыновой является масштабным, комплексным, исследованием, при выполнении которого получены новые, значимые результаты. Диссертационная работа Н.Ю. Мартыновой «Белковые комплексы с участием цитоскелетного белка зиксина в процессах эмбриональной дифференцировки и морфогенеза», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология, является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области молекулярной биологии, углубляющее современные представления о молекулярных механизмах вовлеченности цитоскелетных белков в регуляцию генной экспрессии в ходе эмбрионального развития. По актуальности проблемы, объёму и методическому уровню проведённых исследований, достоверности, научной новизне и практической значимости полученных результатов представленная работа полностью соответствует современным требованиям раздела II "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, от 2 августа 2016 г.

№748, от 01 октября 2018 г. № 1168, от 20 марта 2021 г. № 426, от 24 февраля.2021 г. № 118, от 11 сентября 2021 г. № 1539, от 25 января 2024 г. № 62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а её автор, Мартынова Наталья Юрьевна, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук,
заведующая лабораторией цитоскелетных механизмов метастазирования
НИИ экспериментальной онкологии и канцерогенеза
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России



Глушанкова Наталия Александровна

Подпись Глушанковой Н.А. удостоверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, к.м.н.



Кубасова И.Ю.

07.09.2026г.

Полное название и адрес организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России),

115522, г. Москва, Каширское шоссе 24, тел.: +7 (499) 324-24-24, e-mail: info@ronc.ru

тел. +7 (910) 403-90-23; e-mail: natglu@hotmail.com