

Отзыв

официального оппонента, доктора биологических наук

Шидловского Юлия Валерьевича

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

Диссертационная работа Мартыновой Н.Ю. посвящена одной из ключевых проблем современной биологии развития – выяснению молекулярных механизмов, связывающих морфогенетические движения клеток с генетическими программами дифференцировки. Цитоскелетный белок зиксин, обладающий свойствами механосенсора и способный к ядерно-цитоплазматическому перемещению, рассматривается в литературе как потенциальный интегратор сигналов между клеточной адгезией, цитоскелетом и ядром. Однако, несмотря на интенсивное изучение зиксина в клеточных культурах, его функции в условиях целого развивающегося организма оставались практически не исследованными. Представленная работа впервые на модели *Xenopus laevis* комплексно анализирует роль зиксина в раннем эмбриогенезе позвоночных. Полученные результаты имеют фундаментальное значение для понимания механизмов нейруляции, органогенеза и клеточной пластичности, а также открывают перспективы для биомедицинских приложений. В качестве экспериментальных объектов в работе используются эмбрионы шпорцевой лягушки – классическая модель биологии развития, позволяющая целенаправленно модулировать экспрессию генов и наблюдать фенотипические последствия на организменном уровне. Дополнительными моделями служат эмбрионы *Danio rerio* и линия клеток человека HEK293, что существенно повышает достоверность полученных выводов.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 402 страницах машинописного текста, содержит 82 рисунка и 8 таблиц. Список цитированной литературы включает 449 работ. Диссертация построена по классическому плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературных данных, результаты, обсуждение результатов, материалы и методы, заключение, основные выводы, список цитированной литературы (449 работ) и 5 приложений. Такая структура полностью соответствует требованиям, предъявляемым к

докторским диссертациям, и позволяет последовательно изложить масштабное исследование.

Введение содержит обоснование актуальности темы, формулировку цели и задач исследования, положения, выносимые на защиту, а также сведения о научной новизне, теоретической и практической значимости работы, методологии, апробации результатов и публикациях. Цель работы – изучение механизмов, связывающих морфогенез и экспрессию генов в ходе эмбрионального развития, на примере многофункционального цитоскелетного белка зиксина. В соответствии с целью сформулированы четыре конкретные задачи, которые полностью решены в диссертации.

Обзор литературных данных занимает около 100 страниц и состоит из 12 подразделов. В нём подробно рассмотрены: молекулярная структура зиксина, его посттрансляционные модификации, гомологи и семейство зиксин-подобных белков, белковые партнёры и роль в передаче внутриклеточных сигналов, участие зиксина в регуляции актинового цитоскелета, механотрансдукции, ядерно-цитоплазматическом перемещении, а также его роль в патогенезе заболеваний человека и в эмбриогенезе на различных модельных организмах. Особое внимание уделено функциям зиксина в развитии нервной системы, его взаимодействию с фактором *Xanfl*, участию в сигнальном пути *Hedgehog*, регуляции плюрипотентности и сигналинга ретиноевой кислоты. Обзор написан хорошим научным языком, содержит критический анализ литературы и логически подводит к постановке задач исследования.

Результаты – центральный раздел диссертации, включающий 12 подразделов. В нём последовательно изложены: идентификация и характеристика зиксина *Xenopus laevis* (2.1), анализ его посттрансляционных модификаций, пространственно-временная динамика экспрессии, подтверждение взаимодействия с фактором *Xanfl*, поиск белковых партнёров зиксина, модуляция сигнального пути *Hedgehog* через взаимодействие с *Ptc2*, *Gli1* и *Zic1*, влияние нокдауна и оверэкспрессии зиксина на экспрессию генов, роль комплекса зиксин–*Ybx1* в контроле стабильности мРНК генов *pou5f3*, эволюционная консервативность механизма на моделях *Danio rerio* и НЕК293, влияние зиксина на экспрессию гена *rxrg* и сигналинг ретиноевой кислоты, поиск транскриптов, ассоциированных с *Ybx1*, методом RIP-seq, протеомный анализ динамики интерактома зиксина. Каждый подраздел содержит подробное описание экспериментов, иллюстрирован рисунками и таблицами. Результаты изложены логично, с соблюдением причинно-следственных связей. Обсуждение результатов содержит интерпретацию полученных данных в контексте современной литературы. Автор последовательно обсуждает: идентификацию и характеристику зиксина *Xenopus*, его взаимодействие с *Xanfl* и роль в развитии переднего мозга, модуляцию сигнального пути *Hedgehog*, участие в регуляции стабильности мРНК через

взаимодействие с Ybx1, идентификацию зиготических генов-мишеней комплекса Ybx1/зиксин, а также протеомный анализ динамики белковых комплексов зиксина. Обсуждение построено в форме развёрнутого научного диалога с привлечением обширных литературных данных.

Материалы и методы написаны очень подробно и включают все необходимые разделы: методы работы с ДНК, белковой химии, работы с эмбрионами модельных объектов, молекулярной биологии и анализа генной экспрессии (включая гибридизацию *in situ*, транскрипцию *in vitro*, использование морфолино, люциферазные репортерные системы, фракционирование клеток, РНК-иммунопреципитацию), высокопроизводительное секвенирование транскриптома (RNA-seq), культивирование и трансфекцию клеточных линий, генерацию нокаутной линии HEK293 с использованием CRISPR/Cas9, масс-спектрометрический анализ (DDA и DIA). Детальное описание протоколов позволяет полностью воспроизвести эксперименты.

Заключение содержит краткое резюме основных результатов и их обобщение. Выводы сформулированы чётко и соответствуют поставленным задачам.

Научная новизна и личный вклад соискателя

Диссертационная работа содержит несколько принципиально новых результатов, имеющих фундаментальное значение для молекулярной биологии развития.

1. Идентификация и характеристика зиксина *Xenopus laevis*. Впервые клонирован и охарактеризован ген зиксина у шпорцевой лягушки (раздел 2.1). Выявлена доменная архитектура белка, пространственно-временной паттерн экспрессии (раздел 2.3) и проведён детальный масс-спектрометрический анализ посттрансляционных модификаций, включая N-концевое ацетилирование и фосфорилирование по Ser198, Ser386 и двойное фосфорилирование Thr499/Ser501 в первом LIM-домене (раздел 2.2). Обнаружение фосфорилирования внутри LIM-домена является концептуально новым, так как эти структуры традиционно рассматривались как конститутивно стабильные платформы для белок-белковых взаимодействий.
2. Взаимодействие зиксина с транскрипционным репрессором Xanfl. Впервые показано прямое физическое взаимодействие зиксина с Xanfl (раздел 2.4), опосредованное вторым LIM-доменом зиксина и EN1-доменом Xanfl. Доказано, что это взаимодействие модулирует транскрипционную активность Xanfl и необходимо для нормального морфогенеза переднего мозга (разделы 2.4.4–2.4.5). Этот результат расширяет представления о

механизмах, связывающих цитоскелетную динамику с регуляцией транскрипции.

3. Модуляция сигнального пути Hedgehog. Обнаружены и охарактеризованы взаимодействия зиксина с тремя ключевыми компонентами Hedgehog-каскада – рецептором Ptc2, транскрипционным фактором Gli1 и фактором Zic1 (разделы 2.5–2.6). Показано, что зиксин ингибирует транскрипционную активность Gli1, блокируя его связывание с ДНК (раздел 2.6.2.4), и формирует тройной комплекс Zic1–Gli1–зиксин, модулирующий ядерную транслокацию его компонентов (раздел 2.6.3). Впервые продемонстрировано, что эндогенный зиксин действует как негативный регулятор Shh-сигналинга *in vivo* (разделы 2.6.2.5–2.6.2.6).

4. Посттранскрипционная регуляция стабильности мРНК. Раскрыт принципиально новый механизм, в котором зиксин через взаимодействие с РНК-связывающим белком Ybx1 контролирует стабильность мРНК ключевых регуляторов плюрипотентности (семейство *pou5f3*) и сигнального пути ретиноевой кислоты (*rxrg*) (разделы 2.7–2.10). С использованием RIP-seq с антителами к эндогенному Ybx1 (раздел 2.11) идентифицирован широкий спектр зиготических зиксин-зависимых генов, включая *crx* (*otx5*), *cer1*, *foxn3* и *mix1*, что впервые связывает цитоскелетный белок с посттранскрипционным контролем генов головного организатора.

5. Эволюционная консервативность механизма. Подавление зиксина у *Danio rerio* и в клетках человека HEK293 с нокаутом *ZYXIN* (созданным с помощью CRISPR/Cas9) приводит к активации генов плюрипотентности (*nanog*, *pou5f3*, *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*), что доказывает эволюционную консервативность открытого механизма и его значимость для клеток млекопитающих (раздел 2.9).

6. Протеомный анализ динамики интерактома зиксина. Впервые с использованием количественной масс-спектрометрии (DIA) охарактеризована динамика белковых комплексов зиксина на трёх стадиях раннего эмбриогенеза (гастрола, ранняя и поздняя нейрула). Выявлена двухкомпонентная архитектура интерактома (консервативное ядро из талина, винкулина и актина и динамическая периферия) и стадийно-специфические взаимодействия с Ybx1 (на стадии 14) и Gli1 (на стадии 16) (раздел 2.12).

Личный вклад соискателя не вызывает сомнений. Автором лично проведены ключевые эксперименты: клонирование зиксина, микроинъекции, ко-иммунопреципитации, дрожжевой двугибридный скрининг, анализ данных NGS и масс-спектрометрии. Все публикации по теме диссертации (48 статей в рецензируемых журналах WoS/Scopus, 3 патента) отражают результаты, полученные при непосредственном участии диссертанта.

Степень обоснованности и достоверности научных положений

Достоверность результатов обеспечивается:

1. Комплексом взаимодополняющих методов: дрожжевой двугибридный анализ, ко-иммунопреципитация, pull-down, EMSA, RIP-seq, RNA-seq, масс-спектрометрия (DDA и DIA), CRISPR/Cas9-редактирование, гибридизация *in situ*, количественная ПЦР, люциферазные репортерные тесты.
2. Модельными системами: основной моделью служили эмбрионы *Xenopus laevis* (позволяющие манипуляции с экспрессией генов и наблюдение за фенотипом), дополнительные – эмбрионы *Danio rerio* и линия HEK293. Подтверждение ключевых результатов на эволюционно отдалённых видах существенно повышает обоснованность выводов.
3. Статистической обработкой данных: все эксперименты выполнены в трёх и более биологических повторностях (кроме масс-спектрометрических данных, для которых указано число повторностей). Использованы корректные методы статистического анализа (t-критерий Стьюдента, one-way ANOVA, расчёт FDR для NGS-данных).
4. Контрольными экспериментами: для каждого метода предусмотрены отрицательные контроли (контрольные морфолино, антитела к GFP, мутантные конструкции, «спасение» фенотипа).

Выводы логически вытекают из представленных данных и не противоречат известным литературным фактам.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость. Работа вносит фундаментальный вклад в понимание молекулярных механизмов, связывающих морфогенез и дифференцировку. Предложена новая парадигма, в которой зиксин выступает не как пассивный структурный белок, а как динамически перепрограммируемый скаффолд («механорегуляторный хаб»), интегрирующий механические сигналы от цитоскелета, сигнальные каскады (Hedgehog, ретиноевой кислоты) и посттранскрипционный контроль экспрессии генов через взаимодействие с Ybx1. Идентификация зиготических генов-мишеней (*crx*, *cer1*, *foxn3*, *mix1*) раскрывает новую роль зиксина в формировании головного организатора и переднего мозга.

Практическая значимость. Обнаруженные взаимодействия (зиксин–Ybx1, зиксин–Gli1, зиксин–Xanfl) представляют собой потенциальные мишени для модуляции клеточной пластичности и дифференцировки в регенеративной медицине. Выявленная активация генов плюрипотентности при нокауте *ZYXIN* в клетках человека указывает на возможную роль зиксина как супрессора опухолевого роста. Созданные генетические конструкции (мутанты S198A, S198D, стабильные линии HEK293 с нокаутом *ZYXIN*) и протоколы (RIP для эндогенного Ybx1, разделение ядерной и

цитоплазматической фракций) могут быть востребованы в лабораториях биологии развития и молекулярной онкологии.

Замечания и вопросы по диссертации

Несмотря на высокий общий уровень работы, у меня возникли следующие вопросы и замечания, которые не снижают её научной ценности, но требуют пояснений.

1. По механизму регуляции стабильности мРНК (раздел 2.8). Показано, что зиксин, связываясь с Ybx1, ингибирует образование комплекса Ybx1-мРНК *pou5f3*.3. Однако остаётся неясным, происходит ли это за счёт прямого конкурентного связывания зиксина с РНК-связывающим доменом Ybx1 или же зиксин изменяет конформацию Ybx1, делая его недоступным для РНК. Имеются ли данные о том, связывается ли зиксин с РНК напрямую (например, через LIM-домены)? Каковы молекулярные детали распознавания транскриптов *crx*, *cer1*, *foxn3* и *mix1* фактором Ybx1? Содержат ли их мРНК консервативные мотивы (например, AACAUС или CU-богатые последовательности)?
2. По данным RIP-seq (раздел 2.11). Использование антител к эндогенному Ybx1 и сравнение осаждения в условиях нокдауна зиксина – технически сложный подход. Необходимо уточнить, каким образом оценивалась специфичность осаждения и исключалось неспецифическое связывание мРНК с сорбентом или антителами? Был ли проведён RIP-qPCR для верификации обогащения ключевых генов (*crx*, *cer1*, *foxn3*, *mix1*) помимо NGS-данных?
3. По функциональному значению тройного комплекса Zic1–Gli1–зиксин. Показано, что зиксин стабилизирует комплекс Zic1 и Gli1 и усиливает их транскрипционную активность (Рисунок 42г). Однако ранее было показано, что зиксин ингибирует активность одного Gli1 (раздел 2.6.2.3). Как согласуются эти, на первый взгляд, противоположные эффекты? Предполагается ли, что зиксин действует как контекст-зависимый модулятор: в отсутствие Zic1 – ингибитор, а в его присутствии – коактиватор? Каковы пространственные паттерны коэкспрессии Zic1 и зиксина в нервной пластинке?

При общей высокой оценке диссертационной работы следует отметить ряд мелких недочётов оформительского характера, которые не влияют на научную ценность и достоверность результатов. Можно отметить отсутствие пояснений к сокращениям в подписях к рисункам. На многих рисунках (например, рис. 3, с. 45; рис. 5, с. 53; рис. 11, с. 96) используются аббревиатуры (FA, SF, ECM, RA и др.), которые не расшифрованы непосредственно в подписи. Хотя эти сокращения объяснены в основном тексте или в списке сокращений, их наличие в подписях затрудняет понимание рисунка при беглом просмотре. Также можно указать на неравномерное качество

иллюстративного материала. Некоторые рисунки (например, рис. 25, с. 149; рис. 36, с. 175) имеют низкое разрешение или недостаточную чёткость. Отдельные схемы (рис. 9, с. 89) перегружены мелкими деталями, из-за чего теряется наглядность. Наконец, отсутствует единообразие в обозначении единиц измерения. В одних местах используется «мМ», в других – «mM» (раздел 2.7, с. 194). Также встречается написание «нг/мкл» и «ng/μl». Желательно придерживаться единого стандарта.

Заключение

Указанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не снижают общей высокой оценки диссертационной работы. Работа Мартыновой Н.Ю. является оригинальным, масштабным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. Она вносит существенный вклад в решение важной научной проблемы – выявления молекулярных механизмов интеграции морфогенетических движений и дифференцировки с участием цитоскелетного белка зиксина. Полученные результаты имеют фундаментальное значение для биологии развития, клеточной биологии и молекулярной онкологии.

Диссертационная работа Мартыновой Натальи Юрьевны соответствует критериям (в том числе п. 9), 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; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент, **Шидловский Юлий Валерьевич**

доктор биологических наук,
главный научный сотрудник,
заведующий Лабораторией
регуляции экспрессии генов в развитии
ИБГ РАН

Адрес: 129323, Москва,
Лазоревый пр., 1А-1-43
Тел. +7 916 406 2330
E.mail: yul.biogen@yandex.ru

3 сентября 2026 г.

Подпись Шидловского Ю. В.
удостоверено.
Руководитель
отдела кадров ИБГ РАН
Михайлова Е.А.