

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Мартыновой Натальи Юрьевны «Белковые комплексы с участием цитоскелетного белка зиксина в процессах эмбриональной дифференцировки и морфогенеза», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность диссертационного исследования

Диссертационная работа Натальи Юрьевны Мартыновой посвящена изучению фундаментальной проблемы биологии развития – выявлению молекулярных механизмов, обеспечивающих интеграцию морфогенетических движений клеток с регуляцией экспрессии генов в ходе эмбриогенеза. В качестве ключевой модели выбран цитоскелетный белок зиксин, который благодаря своей способности к ядерно-цитоплазматическому перемещению и взаимодействию с транскрипционными факторами может служить связующим звеном между клеточной адгезией и генной экспрессией.

Несмотря на достаточно интенсивное изучение зиксина в культурах клеток и в контексте онкологических заболеваний, его функции в процессе развития целостного организма оставались малоизученными. Особенно это касается ранних этапов эмбриогенеза, когда синхронизация клеточной дифференцировки и морфогенеза критически важна для правильного формирования тканей и органов. В связи с этим работа Н.Ю. Мартыновой, выполненная на эмбриональной модели *Xenopus laevis* с привлечением эволюционно отдаленных объектов (*Danio rerio*, клетки человека), представляет несомненный интерес как для фундаментальной биологии развития, так и, в перспективе, для регенеративной медицины и онкологии.

Таким образом, тема диссертационной работы Н.Ю. Мартыновой «Белковые комплексы с участием цитоскелетного белка зиксина в процессах эмбриональной дифференцировки и морфогенеза» обладает несомненной актуальностью и имеет важное научное и прикладное значение.

Структура работы

Материал диссертации изложен на 402 страницах машинописного текста, включает в себя 82 рисунка и 8 таблиц. Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями к оформлению диссертаций и состоит из разделов:

«Введение», «Обзор литературных данных» (глава 1), «Результаты» (глава 2), «Обсуждение результатов» (глава 3), «Материалы и методы» (глава 4), «Заключение», «Основные выводы», «Благодарности», «Список сокращений» и «Список литературы», который содержит 449 ссылок на отечественные и зарубежные источники. В работе также представлены пять подробных приложений, включающих описания буферных растворов, векторных конструкций, последовательностей морфолиновых олигонуклеотидов и праймеров, что свидетельствует о высоком уровне методической проработки и обеспечивает воспроизводимость полученных результатов.

Научная новизна и практическая значимость работы

Диссертационное исследование Н.Ю. Мартыновой содержит ряд принципиально новых результатов, которые вносят существенный вклад в молекулярную биологию развития.

Во-первых, автором впервые идентифицирован и охарактеризован ортолог белка зиксина у *Xenopus laevis* (полноразмерная кДНК длиной 1992 п.н., кодирующая белок из 664 аминокислотных остатков; регистрационный номер GenBank EF051627). Проведен детальный анализ его пространственно-временной экспрессии в ходе эмбриогенеза и идентифицированы посттрансляционные модификации, включая N-концевое ацетилирование и фосфорилирование по остаткам серина 198 и 386.

Во-вторых, впервые показана способность зиксина модулировать активность транскрипционного репрессора *Xanf1* на ранних стадиях формирования переднеголовных структур.

Во-третьих, впервые установлено и охарактеризовано прямое физическое взаимодействие зиксина с тремя ключевыми компонентами сигнального пути Hedgehog – транскрипционными факторами *Gli1* и *Zic1*, а также трансмембранным рецептором *Ptc2*. Показано, что зиксин может выступать в качестве скаффолда, стабилизирующего комплекс *Gli1-Zic1*, и оказывать ингибирующее влияние на *Shh*-зависимую транскрипцию в дорсальной части нервной трубки. Примечательно, что взаимодействие зиксина с цитоплазматическим доменом рецептора *Ptc1* эволюционно консервативно и воспроизводится для белков человека, что указывает на фундаментальность данного механизма.

В-четвертых, впервые предложен новый посттранскрипционный механизм регуляции плюрипотентности, в котором зиксин, взаимодействуя с РНК-

связывающим белком Ybx1, препятствует образованию стабилизирующих рибонуклеопротеиновых комплексов Ybx1 с мРНК генов семейства *pou5f3* (ортологов OCT4). Это приводит к ускоренной деградации материнских транскриптов *pou5f3.3* и способствует выходу клеток из плюрипотентного состояния. Показано, что данный механизм эволюционно консервативен: нокаун зиксина у *Danio rerio* активирует экспрессию *nanog*, а нокаут ZYXIN в клетках HEK293 человека приводит к повышению уровня мРНК NANOG, OCT4 и KLF4.

Этот результат впервые показывает, что белок, ассоциированный с клеточной адгезией и цитоскелетом, может напрямую контролировать программу стволовости. Это новый слой регуляции плюрипотентности — не транскрипционный (через OCT4/SOX2/NANOG), а посттранскрипционный (через стабильность мРНК).

В-пятых, с использованием масс-спектрометрического анализа впервые построена количественная карта динамического интерактома зиксина на трех стадиях раннего эмбриогенеза *X. laevis*. Выявлена двухкомпонентная архитектура комплекса — консервативное ядро (талин, винкулин, VASP) и динамическая регуляторная периферия, состав которой меняется в зависимости от стадии развития. Продемонстрирована стадийно-специфичная ассоциация зиксина с Ybx1 (пик на ранней нейруле) и Gli1 (только на поздней нейруле), а также идентифицированы новые потенциальные партнеры — киназы АКТ, адаптеры 14-3-3, каспаза-3.2 и транскрипционный коактиватор YAP1.

Полученные результаты могут быть применены для разработки новых подходов к модуляции клеточной дифференцировки, в том числе в контексте стволовых клеток и регенеративной медицины, а также для понимания механизмов онкогенеза, в котором дисрегуляция функций зиксина играет важную роль.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Положения, сформулированные в диссертации Н.Ю. Мартыновой, основаны на большом объеме фактического материала. Использован комплекс современных методов молекулярной биологии и биологии развития: дрожжевой двугибридный анализ, коиммунопреципитация *in vivo* и *in vitro* (pull-down), масс-спектрометрия, высокопроизводительное секвенирование транскриптомов (RNA-seq) и рибонуклеопротеиновых комплексов (RIP-seq), CRISPR/Cas9-редактирование генома, количественная ПЦР в реальном времени, гибридизация *in situ* на целых зародышах, люциферазные репортерные тесты. Ключевые белок-белковые

взаимодействия подтверждены тремя независимыми методами, а для основных фенотипов проведены «спасающие» (rescue) эксперименты, что существенно повышает достоверность выводов.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием адекватных методов (t-критерий Стьюдента, ANOVA), все количественные эксперименты проведены в трех и более биологических повторностях. Часть работы выполнена на трех модельных системах (*X. laevis*, *D. rerio*, линия клеток человека HEK293), что подтверждает эволюционную консервативность открытых механизмов. Положения выносимые на защиту полностью обоснованы совокупностью приведенных данных, их достоверность не вызывает принципиальных сомнений.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Диссертационная работа Н.Ю. Мартыновой представляет собой завершенное, масштабное и многоплановое исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Обзор литературы (глава 1), занимающий более 100 страниц, является достаточно полным и охватывает все основные аспекты, касающиеся структуры и функций зиксина, сигнальных путей Hedgehog и ретиноевой кислоты, регуляции плюрипотентности у *Xenopus* и роли Ybx1 в посттранскрипционном контроле. Несмотря на некоторую избыточность, на взгляд оппонента, данный раздел дает исчерпывающее представление о современном состоянии проблемы.

Раздел «Результаты» (глава 2) содержит 12 подразделов, последовательно раскрывающих все аспекты работы – от идентификации зиксина у *Xenopus* до системного протеомного анализа динамики его белковых комплексов. Особого внимания заслуживает высокое экспериментальное мастерство автора, проявленное при работе с эмбрионами. Иллюстративный материал (81 рисунок) отличается достаточно высоким качеством и наглядностью.

Раздел «Обсуждение» (глава 3) представляет собой вдумчивый анализ полученных данных. Автор выстраивает логическую цепочку, связывающую открытые молекулярные взаимодействия зиксина с его физиологической ролью в эмбриогенезе, и предлагает обоснованные модели регуляции – от модуляции активности транскрипционных репрессоров до посттранскрипционного контроля стабильности мРНК. Вызывает уважение и то, что автор описывает ограничения и своих исследований. Выводы в целом сформулированы четко и отражают основные результаты работы.

Таким образом, после прочтения рукописи не остается сомнений в научной значимости, новизне и завершенности диссертационной работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям. Материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает исчерпывающее представление о содержании диссертации и степени участия автора в исследованиях. Положения, выносимые на защиту, соответствуют содержанию работы.

Замечания к диссертационной работе

Несмотря на высокий общий уровень работы, при ее прочтении возник ряд вопросов и замечаний, что не удивительно при таком масштабном исследовании. Однако, эти замечания не носят принципиального характера и не снижают общую положительную оценку диссертации.

Замечания к разделу «Обзор литературы»

1. В разделе «Обзор литературы» (глава 1) содержится значительное количество информации, лишь косвенно относящейся к теме диссертации. Например, разделы 1.5.1–1.5.6, посвященные роли зиксина в патогенезе сердечно-сосудистых, онкологических, фиброзных, воспалительных и неврологических заболеваний, занимают более 10 страниц, но практически не связаны с основной задачей работы – изучением функций зиксина в эмбриогенезе. Кроме того, некоторая часть обзора – это своего рода анонс главы «Результаты». Сокращение подобных разделов позволило бы сфокусироваться на более подходящих аспектах.

2. В обзоре, на мой взгляд, не хватает краткого описания эмбриогенеза *Xenopus laevis* (стадии развития, ключевые морфогенетические события, термины MBT, гаструляция, нейруляция). Это могло бы помочь ориентироваться в экспериментальных данных читателю, не являющемуся специалистом в области биологии развития данного организма.

3. В разделе 1.10, посвященном Ybx1, не упомянут белок FRGY2 (основной белок мРНК-частиц ооцитов *Xenopus*, гомолог Ybx2 человека), хотя его роль в раннем эмбриогенезе хорошо известна. Вместе с тем,

описание сайта связывания YRS как сайта, узнаваемого YB-1, не вполне корректно, поскольку данный сайт был охарактеризован для белка FRGY2. Кроме того, белок мыши MSY2, упомянутый в разделе 1.10, является ортологом YB-2, а не YB-1

4. Встречаются англицизмы и термины, не вполне соответствующие русскоязычной научной традиции, например, «постериоризовать», «спасение» (в значении *rescue*). В целом, однако, стиль изложения профессиональный и достаточно ясный.

Замечания к разделу «Результаты»

1. В практически всех экспериментах с МО-РНК (морфолиновые олигонуклеотиды) они инъецируются на стадии 2-4 клеток, а эффекты анализируются значительно позже. За это время происходит множество морфогенетических событий. Как автор исключает, что наблюдаемые изменения в экспрессии не являются вторичными следствиями нарушения общей морфологии, а отражают прямое влияние зиксина?
2. Анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) проведен с белком Gli 1 и зиксином на грубых экстрактах эмбрионов, а не на очищенных рекомбинантных белках (рис. 38А, стр. 181). Уменьшение сдвига полосы в присутствии зиксина может быть вызвано не прямым блокированием связывания Gli1 с ДНК, а, вторичными эффектами, например, усилением протеолитической деградации Gli1 или изменением его фосфорилирования. Для окончательного доказательства прямого ингибирования целесообразно повторить EMSA с очищенными белками и ДНК *in vitro*.
3. Ко-иммунопреципитация (рис. 42, стр. 189–193). показывает, что зиксин, Zic1 и Gli1 присутствуют в одном осадке. Однако это не доказывает образование тройного комплекса, поскольку возможно сосуществование двух разных двухкомпонентных комплексов (зиксин–Zic1 и зиксин–Gli1). Для строгого доказательства тройного комплекса необходим последовательный иммунопреципитационный анализ (IP за один белок, а затем IP из полученного иммунопреципитата за другой).
4. Второй LIM-домен зиксина является ключевым доменом для взаимодействия с белками партнерами. Какие его особенности, по сравнению с доменами LIM-1 и LIM-3, обуславливают эту его способность?

5. В тексте описывается (стр. 171) эксперимент с усеченной версией зиксина (с делецией LIM2 (FLAG-Zyx-delta2)). Однако рисунка для эксперимента в манускрипте нет.
6. На рисунке 57 показано, что оверэкспрессия зиксина приводит к увеличению количества Ybx1 в цитоплазме и его уменьшению в ядре. Поскольку Ybx1 стабилизирует мРНК *rou5f3* именно в цитоплазме (это ведь материнский транскрипт), следовало бы ожидать, что оверэкспрессия зиксина будет усиливать стабилизацию мРНК. Однако в работе показано обратное – оверэкспрессия зиксина подавляет уровень мРНК *rou5f3*. Очевидное объяснение, которое подразумевается авторами, но к сожалению, четко не проговаривается в этом подразделе, состоит в том, что зиксин не просто перераспределяет YB-1 в цитоплазму, а, более важно - препятствует взаимодействию YB-1 с мРНК *rou5f3*. Без этого объяснения, получается, что рисунок 57 выпадает из общей логики исследования. Кроме того, на мой взгляд, в работе нет доказательства того, что это связывание прямое. Ybx1 может осаждаться вместе с целым рибонуклеопротеиновым комплексом, где мРНК *rou5f3* связана с другим белком, а Ybx1 сидит рядом. Здесь был крайне необходим эксперимент EMSA с очищенным Yb-1 и 3'-UTR мРНК *rou5f3* *in vitro*, а также эксперимент с добавлением зиксина (препятствует ли он взаимодействию YB-1 с РНК).
7. Список мРНК, которые взаимодействуют и, вероятно, стабилизируются YB-1, оказался небольшим (даже если расширить его до 300 изначальных генов. Это говорит о том, что, по-видимому, имеет место не глобальная стабилизация клеточной мРНК, а избирательная. Поскольку все известные мне случаи специфической регуляции стабильности мРНК белком YB-1 обусловлены образованием многокомпонентного белкового комплекса на мРНК, это также говорит в пользу непрямого взаимодействия YB-1 со стабилизируемыми мРНК. Не сопоставляли ли вы список найденных мРНК с литературными данными eCLIP или PAR-CLIP на предмет поиска прямых взаимодействий YB-1 с некоторыми мРНК из вашего списка.
8. Из 300 генов, дифференциально осажденных с Ybx1, автор отбирает 4 (сгх, mix1, foxn3, ser1) для дальнейшего анализа. Однако в тексте не приведен полный список 300 генов с указанием уровня обогащения и статистической значимости. Это создает риск субъективного отбора (пусть и подкрепленного авторскими критериями). Было бы неплохо представить полный список в

виде дополнительной таблицы в приложении, провести GSEA-анализ по всем генам, чтобы показать, что среди них статистически значимо обогащены именно гены, связанные с развитием переднего мозга.

9. Автор показывает, что механизм стабилизации мРНК белком YB-1 может работать для зиготических генов (*crx*, *mix1*, *foxn3*, *cer1*). Однако для материнских генов (*pou5f3.3*) вы предполагали, что Ybx1 защищает их в цитоплазме. В случае зиготических генов синтез происходит в ядре, затем РНК экспортируется в цитоплазму. Если зиксин выводит Ybx1 в цитоплазму из ядра (Рис. 57), то он возможно влияет и на ядерную роль YB-1 в регуляции транскрипции зиготических генов. Не проверяли ли авторы такой вариант регуляции зиготических генов?
10. На тепловых картах (раздел 2.12, рис. 75, 78) использована Z-score нормализация, которая показывает относительную динамику внутри каждого белка, но не отражает абсолютную силу взаимодействия (fold enrichment по сравнению с контролем) и не учитывает статистическую значимость. Для строгой оценки динамики интерактома желательно было представить таблицы с fold enrichment и p-value для ключевых партнеров (VASP, Talin, Ybx1, Gli1, YAP1) на каждой стадии.
11. Показано, что зиксин взаимодействует с Ybx1 только на стадии 14. Однако функциональные эффекты на стабильность мРНК *pou5f3.3* наблюдаются уже на стадии 11 (гаструла). Как вы объясняете это несоответствие? Возможно, взаимодействие на стадии 11 существует, но не детектируется в условиях Co-IP или оно было и на 11 стадии, но слабее?, К сожалению, даже на тепловых картах данные по YB-1 не показаны. Кроме того, каковы, на ваш взгляд, механизмы переключения связывания зиксина со своими партнерами. Почему до определенной стадии белки взаимодействуют, а потом – нет?
12. Если для экспериментов по протеомному анализу берутся целые эмбрионы, то при анализе целого эмбриона получается усредненный сигнал, что возможно искажает тканеспецифичные взаимодействия. Или для анализа использовались изолированные препараты нервных пластинок, например (в явном виде я не нашел данную информацию)?
13. Насколько мне известно белок FRGY2 *Xenopus laevis* не исчезает (не деградирует) полностью из эмбрионов (в отличие от MSY2 мыши, например). В виду большого сходства гомологов, можно предположить, что YB-2

(FRGY2) тоже участвует в регуляции экспрессии генов по механизмам аналогичным для YB-1. Есть ли данные об этом или о взаимодействии YB-2 с зиксином?

Замечания к разделу «Обсуждение» и «Выводы»

1. В выводе 7 (стр. 309) зиксин фигурирует как «ключевой механорегуляторный хаб». Однако, строго говоря, прямых экспериментов по механотрансдукции (приложение силы, измерение натяжения) в работе не представлено. Данное утверждение является скорее гипотезой, требующей дальнейшей проверки.

Заключение

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Мартыновой Натальи Юрьевны «Белковые комплексы с участием цитоскелетного белка зиксина в процессах эмбриональной дифференцировки и морфогенеза» полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями), предъявляемым к докторским диссертациям, а сам диссертант, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник
группы регуляции биосинтеза
белка Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт белка
Российской академии наук,
доктор биологических наук

14 августа 2026 г.



Лябин Дмитрий Николаевич

Тел. 8(916)8292401,

lyabin@vega.protres.ru

Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 4, 142290

Подпись к.б.н. Лябина Д.Н.

заверяю

Ученый секретарь Института белка РАН



к.б.н. Е.Ю. Никонова