

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Билана Дмитрия Сергеевича** «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Изучение внутриклеточных процессов с участием соединений с высокой реакционной способностью представляет актуальную задачу для современной биологии. К сегодняшнему дню доказана роль активных форм кислорода, азота, серы, галогенов в различных биологических реакциях, определяющих как поддержание функций клеток в норме, так и при развитии многих патологических состояний. Таким образом, изучение механизмов регуляции низкомолекулярных редокс-активных соединений, их взаимодействий с различной природы компонентами клеток, а также функционирование систем, контролирующих их концентрации, несет огромную ценность прежде всего для медицины, позволяя устанавливать молекулярные механизмы того или иного заболевания. Явление окислительного стресса признается научным сообществом важнейшим повреждающим фактором, лежащим в основе многих патологических процессов. Однако в свете новейших сведений окислительный стресс слишком широкое понятие, отражающее лишь общее редокс-состояние клетки, поэтому крайне важно выявлять роль каждого конкретного соединения, участвующем в окислительном стрессе. Это касается не только патологий, но и физиологических механизмов редокс-регуляции. Например, такие соединения, как H_2O_2 , H_2S , NO признаны важнейшими сигнальными молекулами, их образование, пути внутриклеточных реакций зачастую даже не пересекаются, что еще раз подчеркивает необходимость исследования каждого из таких регуляторов по отдельности. Однако здесь возникают трудности инструментального характера. Соединения с высокой реакционной способностью всегда вызывали трудности для исследователей. Реагируя с широким спектром мишеней практически сразу с момента своего образования в системе, активные формы кислорода, азота, серы, галогенов практически неуловимы для исследователей в живых системах несмотря на весь доступный арсенал методов современной биохимии.

Появление генетически кодируемых биосенсоров, которые представляют собой химерные белки из флуоресцентных и сенсорных доменов, позволили вывести исследования редокс-процессов в живых системах на новый уровень. Ген такого биосенсора можно доставить в любые интересующие клетки как на уровне культур, так и тканей живых организмов, что, например, невозможно для синтетических биосенсоров небелковой природы. К биосенсору можно добавить сигнальную метку, локализовав

инструмент в интересующем исследователя внутриклеточном компартменте. Флуоресцентный сигнал биосенсора отражает динамику изучаемого редокс-параметра в живой системе, в том числе на протяжении длительного времени, при этом не вызывая повреждений.

Билан Дмитрий Сергеевич является одним из ведущих мировых специалистов в области разработок генетически кодируемых редокс-биосенсоров. Список его публикаций показывает, что Билан Д.С. участвовал в создании целых семейств подобных биосенсоров, среди них биосенсоры на H_2O_2 , pH, редокс-статус пулов глутатиона и НАД, гипогалогенные кислоты и различные их производные. Сложность создания биосенсора заключается в подборе специфичного сенсорного домена и интеграции в его структуру флуоресцентного белка, позволяющего визуализировать взаимодействие сенсорного домена с анализируемым соединением.

В этом плане диссертационная работа Дмитрия Сергеевича носит пионерский характер. В диссертации представлен первый в мире генетически кодируемый инструмент для визуализации динамики компонентов галогенирующего стресса, который автор назвал Нуросcrates. К продуктам галогенирующего стресса относят крайне реакционноспособные кислоты $HOCl$ и $HOBr$, а также менее агрессивные, но не менее значимые для редокс-гомеостаза $HOSCN$, различные производные таких кислот, например, модифицированные амины. Гипогалогенные кислоты и $HOSCN$ образуются в организме благодаря действию гемовых пероксидаз в присутствии H_2O_2 и соответствующих ионов. Долгое время единственной биологической функцией таких соединений определяли их участие в иммунной защите, поэтому такие ферменты содержат нейтрофилы и тканевые макрофаги. При различных нарушениях функций иммунной системы регуляция таких соединений в организме выходит из под контроля. Это подтверждается тем, острые или хронические типы воспалений при различных заболеваниях сопровождаются появлением маркеров галогенирующего стресса в клетках. С этой точки зрения создание биосенсора данного типа позволило бы оценивать активность таких провоспалительных ферментов, как миелопероксидаза. Гипогалогенные кислоты и их производные представляют собой настолько мощные окислители, что их селективное взаимодействие с биологическими молекулами не воспринималось всерьез до тех пор, пока не было обнаружено сразу несколько бактериальных транскрипционных факторов, которые специфично взаимодействуют с $HOCl$ и производными. Выяснено, что такие механизмы позволяют бактериям запускать защитные механизмы в виде транскрипционного ответа. Примеров, что даже такие агрессивные соединения, могут селективно регулировать работу белковых молекул становится все больше. На этой идее команда под руководством Билана Д.С.

разработала первый селективный биосенсор на основе белка NemR из *E.coli*. С помощью этого инструмента автор с коллегами впервые визуализировал динамику галогенирующего стресса, возникающего в фагосоме нейтрофилов человека при уничтожении бактерий, а также впервые показали динамику H_2O_2 и гипогалогенных кислот в режиме развития воспаления, вызванного повреждением, в тканях модельного объекта *Danio rerio*.

Билан Дмитрий Сергеевич работал не только над созданием новых молекулярных инструментов, но оптимизировал уже существующие, позволяя их применять в новых условиях. Например, разными лабораториями создана обширная коллекция биосенсоров для регистрации редокс-состояния пула глутатиона. Принцип основан на введении пары редокс-активных остатков цистеина в структуру флуоресцентных белков. Однако все созданные на сегодняшний день версии были разработаны на белках с зеленой эмиссией флуоресценции. При этом биосенсор с красной эмиссией флуоресценции более предпочтителен для биологических объектов. Свет с большей длиной волны менее токсичен, в диапазоне красного флуоресцентного канала меньше уровень аутофлуоресценции. Кроме того, наличие спектрально различающихся биосенсоров позволяет их комбинировать одновременно в пределах одного объекта изучения. Биланом Д.С. впервые разработаны версии биосенсоров для определения редокс-состояния глутатиона на основе красных флуоресцентных белков. Доказана их эффективность применения с различными другими биосенсорами, что значительно увеличивает количество получаемых данных за одну серию эксперимента.

Все чаще обсуждается необходимость исследований в *in vivo* моделях. Дело в том, что культивируемые клетки или ткани *ex vivo* зачастую демонстрируют существенные биохимические отличия от тех, которых протекают в целостных живых системах. Патологические состояния клеток определяются не только внутриклеточными процессами, но и нарушением взаимодействий с другими клетками, в том числе других типов. Исследованиям редокс-процессов *in vivo* с помощью генетически кодируемых биосенсоров посвящена значительная часть диссертации Билана Д.С. В частности, автор ставит вопрос о роли H_2O_2 , как одного из самых химически стабильных и биологически значимых представителей активных форм кислорода, в патогенезе ишемических повреждений. Для этого автора тщательно исследует динамику интересующего параметра в разных типах клеток лабораторных животных *in vivo* (грызунов и рыб *Danio rerio*) в условиях ишемии. Важно отметить, что молекулярные инструменты, новые модели исследований патологий с их применением разработаны под руководством или непосредственном участии автора представленной диссертации.

Диссертационная работа Билана Д.С. построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, благодарности. Работа изложена на 351 странице печатного текста и включает 85 рисунков и 5 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 905 источников, включая классические и современные работы.

В разделе «Введение» автор описывает актуальность своих исследований, подводя читателя к формулированию цели. Задач, позволяющих реализовать поставленную цель, автор приводит всего 4, однако их формулировка позволяет ясно оценить масштаб планируемых исследований. Автор подробно излагает новизну своих исследований, какую практическую и теоретическую значимость они могут принести. В этом разделе также кратко приведены основные используемые методы и модели в работе и, что очень важно, автор отмечает сотрудничество с другими лабораториями, с которыми были выполнены совместные эксперименты. Это позволяет оценить личный вклад автора в представленной работе.

Свой раздел «Обзор литературы» Билан Д.С. разбивает на две большие части. Первая часть посвящена редокс-биологии. Автор приводит исторический экскурс, как развивалась эта область, как пересматривались концепции о редокс-механизмах регуляции в свете поступающих новых данных. Билан Д.С. сосредотачивается в большей степени на описании низкомолекулярных редокс-активных компонентов клетки, чему, собственно, и посвящена его работа. Отдельные главы посвящены активным формам кислорода, галогенов, азота, серы. В них Билан Д.С. рассматривает основные пути образования подобных соединений, их возможные реакции в клетках, а также какие биологические системы контролируют их концентрации и времена жизни. Вторая часть раздела посвящена биосенсорам, и прежде всего Билан Д.С. дает развернутое определение термину «биосенсор», какие они бывают и подытоживает какому классу биосенсоров посвящена его работа. Поскольку рассматриваемые биосенсоры основаны на флуоресцентных белках, Билан Д.С. дает информацию о семействе этих белков и их краткой классификации. Наиболее ценной частью «Обзора литературы», на мой взгляд, является представленная систематика генетически кодируемых редокс-биосенсоров. Билан Д.С. приводит описание всех существующих на данный момент версий. Будучи признанным экспертом в этой области, автор описывает преимущества и недостатки каждого инструмента. По сути, это является хорошим пособием для любого пользователя, который решает использовать в своих исследованиях данный тип молекулярных инструментов.

В разделе «Материалы и методы» Билан Д.С. подробно описывает все методы, используемые в экспериментах. В представленной работе автор использует большое количество разнообразных методов, включая методы работы с генетическими конструкциями и белками, флуоресцентную и абсорбционную виды спектроскопий, спектроскопию комбинационного рассеяния, разные виды микроскопии, проточную цитометрию, работу с клеточными культурами, включая как известные клеточные линии, так и культуры первичных клеток (нейрональные культуры, зрелые и неонатальные кардиомиоциты животных, выделенные нейтрофилы человека). Автор работает над созданием и оптимизацией разных инструментов, но делит используемые методы на широко применяемые и рутинные в лабораторной практике и специализированные, которые применяются к конкретному изобретению. Такое повествование выглядит очень логичным и существенно облегчает поиск информации по конкретным экспериментам. Так же в отдельные подглавы приведена информация об используемых в работе животных (мышь, крысы, рыбы *D.rerio*), о технике применяемых хирургических манипуляций по моделированию патологических состояний (выделение клеток для первичных культур, тканей органов для *ex vivo* исследований, моделирование ишемического инсульта головного мозга и гипергликемии у грызунов, моделирование гипоксии различных тканей и воспалительных реакций у *D.rerio*). Приводятся протоколы этических комиссий. Анализ полученных данных проводился с использованием современного программного обеспечения. Разнообразие современных методов, используемых автором, безусловно, свидетельствует о высоком уровне работы.

Раздел «Результаты и обсуждение» поделен автором на две части. Первую часть Билан Д.С. посвящает описанию создания и тестирования новых редокс-биосенсоров. Вторая часть посвящена исследованию редокс-процессов в *in vivo* моделях с помощью генетически кодируемых инструментов.

Билан Д.С. подробно описывает стратегию получения красного флуоресцентного биосенсора для определения редокс-статуса глутатиона. Для этого были выбраны наиболее яркие белки mCherry, mRuby2 и mKate2, в структуру которых были введены пары близкорасположенных остатков цистеина, кроме того, через гибкий линкер к модифицированным версиям флуоресцентных белков добавлялся глутаредоксин. Предполагалось, что изменение соотношения GSH/GSSG в среде будет приводить к изменению редокс-состояния белка (образованию или восстановлению дисульфидной связи между введенными остатками цистеина), что отразится на изменении структуры и, как следствие, флуоресцентного сигнала. После тестирования нескольких десятков версий, реализации подходов оптимизации путем рационального и случайного мутагенезов

последовательностей, были отобраны биосенсоры Grx1-roKate и Grx1-roCherry. Автор подробно описывает их свойства, определяя спектральные характеристики в восстановленном и окисленном состояниях, селективность, чувствительность к изменению pH, свойственную многим флуоресцентным белкам, и другим биологически значимым окислителям, проведены расчеты редокс-потенциалов. Работоспособность биосенсора проверялась как *in vitro* на белке, так и в клетках бактерий и эукариот. Оказалось, что наиболее перспективной является версия Grx1-roCherry, поскольку Grx1-roKate в эукариотической системе оказался не способным к восстановлению и возвращению сигнала к исходным значениям после выраженного окислительного стресса для клеток. Версия Grx1-roCherry демонстрирует схожие свойства с ранее полученной популярной зеленой версией Grx-roGFP2, при этом версия красного биосенсора оказалось более легкоокисляемой, что подтверждается значениями потенциалов (-311 мВ для Grx1-roCherry в сравнении с -290 мВ для Grx-roGFP2 при pH 7,0). В ходе дальнейшего тестирования автор сочетает использование Grx1-roCherry в различных клеточных моделях в комбинации с разными спектрально различающимися биосенсорами, включая Grx-roGFP2 (GSH/GSSG), SoNar (NAD⁺/NADH), SypHer2 (pH). Например, удалось показать, что редокс-взаимодействия между разными компартментами отличаются у разных типов клеток, сравнивались линии клеток онкотипа, а также здоровые клетки первичных культур животных.

Другой биосенсор Hurocrates, который был разработан Биланом Д.С., представляет первый в мире генетически кодируемый инструмент для регистрации активных форм галогенов. Автор приводит рассуждения о выборе возможного белкового домена для разрабатываемого биосенсора и останавливается на транскрипционном факторе NemR, в структуру которого по разным позициям интегрировали желтый флуоресцентный белок. В результате было получено несколько пробных версий биосенсора и отобрана наиболее яркая, демонстрирующая наибольшую амплитуду ответа при взаимодействии с HOCl (до 1,6 раз). Оказалось, что Hurocrates демонстрирует чувствительность не только к гипогалогенным кислотам HOCl и HOBr, но и так называемой псевдогипогалогенной HOscn и производным, например, к хлоротаурину. Автор позиционирует этот результат положительным, поскольку и в естественных условиях гемовые пероксидазы образуют смесь продуктов. Поэтому их общая регистрации позволяет оценить общую динамику галогенирующего стресса, что актуально в живых системах. Примечательно, что Hurocrates демонстрирует обратимый ответ, что позволяет применять инструмент при многократных воздействиях активных форм хлора. При этом Hurocrates не демонстрирует изменения сигнала в присутствии большинства окислителей другой природы, которые встречаются в

клетке, за исключением пероксинитрита, поэтому автор рекомендует использование контроля активности NO-синтаз в некоторых моделях. Механизм Hupocrates подтвержден созданием контрольной версии, отсутствие ключевого остатка цистеина приводит к потере сигнала. Эта же версия, названная HupocratesCS рекомендована к использованию в качестве контроля, в том числе для оценки воздействия изменений pH. Кроме того, в сотрудничестве с коллегами из Бельгии авторы расшифровали пространственную структуру HupocratesCS методом рентгеноструктурного анализа. Следует подчеркнуть, что автором впервые в мире расшифрована структура редокс-биосенсора на основе циркулярно пермутированного флуоресцентного белка. Это несет ценность не только для понимания механизма работы данного белка, но может оказаться полезным в общем для разработок подобных биосенсоров. Биосенсор был проверен в культурах человеческих клеток как при экзогенной добавке гипогалогенных кислот, так и при эндогенной их генерации при формировании фагосом нейтрофилами человека при фагоцитозе бактериальных клеток.

В части, посвященной исследованию редокс-процессов *in vivo*, Билан Д.С. задает вопрос о роли H_2O_2 в патогенезе ишемических состояний. Считается, что активные формы кислорода играют ключевую роль в повреждении клеток при воздействии гипоксии и последующей реоксигенации. Однако динамика активных форм кислорода в этом процессе не была показана напрямую. При участии Билана Д.С. было создано целое семейство биосенсоров HupPer для регистрации H_2O_2 , выполняющим функцию регулятора при низких концентрациях и повреждающего окислителя при избыточных. Автором были выбраны наиболее чувствительные к ишемии органы, а именно ткани головного мозга и сердца. Для оценки динамики H_2O_2 при гипоксии в клетках в культуре, была создана установка, позволяющая очень быстро и точно изменять концентрацию кислорода в окружающей среде клетках. Были протестированы нейроны, выделенные из мышей, а также кардиомиоциты крыс. В этой модели не было обнаружено существенных изменений динамики H_2O_2 по сигналу HupPer7 как в условиях длительной аноксии, так и при реоксигенации. Единственное отличие удалось показать в культуре зрелых кардиомиоцитов, выделенных из взрослых крыс. В этом случае с момента начала гипоксии было выявлено увеличение концентрации H_2O_2 в матриксе митохондрий. Редокс-отличия неонатальных и зрелых кардиомиоцитов в условиях гипоксии также были подтверждены автором с использованием подхода спектроскопии комбинационного рассеяния. Было показано, что неонатальные клетки отличаются менее эффективной дыхательной цепью митохондрий, что, вероятно, и связано с отсутствием продукции H_2O_2 . Билан Д.С. поднимает важный вопрос о том, корректно ли сравнивать протекание редокс-процессов в клетках в культуре и в условиях органов *in vivo*. Поэтому следующим шагом стала

разработка моделей по оценке динамики окислительного стресса в условиях ишемии органов на лабораторных животных. При сотрудничестве с коллегами из МГУ им. Ломоносова была разработана установка, позволяющая регистрировать флуоресцентный сигнал биосенсора в клетках глубоких слоев мозга грызунов через имплантированные в ткань световоды сразу по нескольким координатам. Прямо во время регистрации животным можно моделировать острые патологические состояния, в представленной работе описана модель ишемического инсульта, вызванного перекрытием мозговой артерии. Таким образом, подход позволил регистрировать сигнал биосенсора в клетках мозга с момента начала развития инсульта. На этой модели автором был получен ряд уникальных сведений. Например, 1) H_2O_2 образуется в клетках мозга в острой фазе ишемического инсульта в небольших количествах, медленно нарастая в течение последующих 2х суток; 2) астроциты характеризуются более окисляющей внутриклеточной средой по сравнению с нейронами; 3) высокий гликемический статус усугубляет тяжесть инсульта, но это не сказывается на динамике H_2O_2 ; 4) показаны существенные отличия сравниваемого редокс-параметра в культуре выделенных клеток и тканях мозга *in vivo*, что несет особую ценность, поскольку многие исследования сложных патологических процессов ограничены использованием клеточных культур или срезов тканей. В своей работе автор использует в качестве модельных организмов не только грызунов, но и рыбу *Danio rerio*, которая набирает все большую популярность в исследованиях по всему миру. Созданная установка для моделирования условий гипоксии в клеточных культурах, позволила моделировать автору аналогичные условия и для тканей *D.rerio*. Прозрачность этого организма позволяет наблюдать динамику одновременно в клетках разных органов. В частности, было проверено, как на гипоксию реагирует биосенсор NuPer, локализованный в митохондриях и цитозоле клеток тканей головного мозга и сердца. Рост H_2O_2 при гипоксии в этой модели обнаружен исключительно в матриксе митохондрий, при этом H_2O_2 не проникает в цитоплазму и нейтрализуется также в митохондриях при возвращении уровня кислорода в норму. На этом же объекте с коллегами из Франции Билан Д.С. исследовал одновременную динамику H_2O_2 и гипогалогенных кислот с помощью разработанных с его участием биосенсоров в тканях при развитии воспаления, вызванным механическим повреждением. Впервые было напрямую показано, что в области воспаления H_2O_2 напрямую конвертируется в активные формы галогенов.

В своей работе автор также приводит задел для последующего развития исследований *in vivo*. Автор обсуждает преимущества многофотонного возбуждения флуоресценции биосенсоров при их использовании в тканях животных. При сотрудничестве с коллегами из МГУ выпущен целый цикл работ о характеристиках

различных биосенсоров в режиме многофотонного возбуждения. Важно, что спектры многофотонного возбуждения могут существенно различаться у биосенсоров даже на основе одного и того же флуоресцентного белка при том, что их положения максимумов в спектрах однофотонного возбуждения полностью совпадают. Это крайне полезные сведения при работе с данными биосенсорами в данном режиме *in vivo*.

В разделе «Заключение» Билан Д.С. подводит итоги своего исследования, обсуждает их значимость для мировой науки и дальнейшие перспективы развития области редокс-биологии. Далее автором формулируется 8 выводов, соответствующих цели и задачам исследования.

Материалы диссертационной работы Билана Д.С. опубликованы в 42 статьях в международных рецензируемых журналах, включая такие высокорейтинговые как Nature Communications, Redox Biology, Cell Metabolism, Free Radical Biology & Medicine и другие, автор выступал на многочисленных научных мероприятиях всероссийского и международного уровней. Представленные результаты отражены в публикациях автора.

Диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича во многом носит пионерский характер. Созданные им молекулярные инструменты востребованы и широко применяются в других лабораториях, в том числе зарубежных. Представленные модели и полученные с их помощью результаты важны не только для изучения фундаментальных процессов при исследуемых типах патогенеза, но и могут служить основой для поиска и тестирования новых подходов терапии.

Хотелось бы добавить следующие вопросы и пожелания по работе:

- 1) Автором создана целая коллекция флуоресцентных биосенсоров. Регистрация флуоресценции зачастую сопряжена с появлением артефактов измерений особенно в сложных биологических системах. В этом смысле надежнее было бы использовать подход измерения времени жизни флуоресценции. К сожалению, в работе это не освещено. Созданные инструменты в данном режиме не тестировались.
- 2) Автором получен уникальный биосенсор Нурocrates и впервые расшифрована пространственная структура биосенсора на основе *сpYFP*. Нурocrates несмотря на его полезность обладает рядом недостатков, среди них чувствительность к изменениям pH, пероксинитриту, не очень высокая амплитуда ответа (до 1,6 раз, при этом некоторые биосенсоры на основе того же флуоресцентного белка демонстрируют изменения сигнала в разы). Почему, имея точные данные о структуре белка, автор не воспользовался ими и не попытался поставить

рациональный выбор стратегии мутагенеза с целью улучшить свойства инструмента?

- 3) В острой фазе ишемического инсульта в клетках мозга крыс *in vivo* автор отмечает небольшую продукцию H_2O_2 . На основе чего автор делает вывод, что концентрация H_2O_2 в данной системе небольшая? Можно ли получить количественную оценку, как это было сделано автором при переводе сигнала биосенсора SypHer3s в конкретные величины pH?

По моему убеждению, работа Билана Д.С. «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований» отвечает всем требованиям, 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; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101; 25.01.2024 № 62), а ее автор, Билан Дмитрий Сергеевич, несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией физической биохимии
Института биохимии им. А.Н. Баха
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
доктор химических наук, профессор

Александр Павлович Савицкий

02.10.2024

119071, г. Москва,
Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.
Тел. +7 (495) 954-87-25. E-mail: apsavitsky@inbi.ras.ru

Подпись д.х.н. Савицкого А.П. удостоверяю

Ученый секретарь
ФИЦ Биотехнологии РАН
к.б.н.



Орловский Александр Федорович