

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 наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 15.02.2023 г. № 4

О присуждении **Костюку Александру Игоревичу**, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров» по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология принята к защите 31 октября 2022 г. (протокол заседания № 27) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе ИБХ РАН (адрес: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10; действует на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021).

Соискатель – Костюк Александр Игоревич, 21 июня 1994 года рождения. В 2018 году соискатель закончил магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» по направлению «биохимия». С 2019 по 2022 гг. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящий момент работает в должности младшего научного сотрудника в Российском национальном исследовательском медицинском университете имени Н. И. Пирогова, а также в Группе метаболических основ патологии ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в Группе метаболических основ патологии Отдела метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН. Научный руководитель – кандидат биологических наук **Билан Дмитрий Сергеевич**, старший научный сотрудник, заведующий Группой метаболических основ патологии ИБХ РАН.

Официальные оппоненты **Савицкий Александр Павлович**, профессор, доктор химических наук, заведующий Лабораторией физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, и **Соколов Алексей Викторович**, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией биохимической генетики Отдела молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного научного

учреждения "Институт экспериментальной медицины" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (Москва) в своем **положительном** отзыве, подписанном Митькевичем Владимиром Александровичем, доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН, главным научным сотрудником Лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии, и утвержденном директором института, академиком РАН, доктором биологических наук Георгиевой Софией Георгиевной, указала, что диссертационная работа Костюка Александра Игоревича «Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров» 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 кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 6 работ общим объемом 15 печатных листов, 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 А.И. Костюк внес основной либо существенный вклад, включают:

1. **Kostyuk, A. I.**, Panova, A. S., Bilan, D. S., & Belousov, V. V. (2018). Redox biosensors in a context of multiparameter imaging. *Free Radical Biology and Medicine*, 128, 23-39. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.004
2. **Kostyuk, A. I.**, Demidovich, A. D., Kotova, D. A., Belousov, V. V., & Bilan, D. S. (2019). Circularly Permuted Fluorescent Protein-Based Indicators: History, Principles, and Classification. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4200. DOI: 10.3390/ijms20174200
3. **Kostyuk, A. I.**, Kokova, A. D., Podgorny, O. V., Kelmanson, I. V., Fetisova, E. S., Belousov, V. V., & Bilan, D. S. (2020). Genetically Encoded Tools for Research of Cell Signaling and Metabolism under Brain Hypoxia. *Antioxidants*, 9(6), 516. DOI: 10.3390/antiox9060516
4. **Kostyuk, A. I.***, Panova, A. S.*, Kokova, A. D., Kotova, D. A., Maltsev, D. I., Podgorny, O. V., Belousov, V. V., & Bilan, D. S. (2020). In vivo imaging with genetically encoded redox biosensors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8164. DOI: 10.3390/ijms21218164 (* - авторы внесли равный вклад в работу)
5. Chebotarev, A. S., Lanin, A. A., Raevskii, R. I., **Kostyuk, A. I.**, Smolyarova, D. D., Bilan, D. S., Savitskii, I. V., Fedotov, A. B., Belousov, V. V., & Zheltikov, A. M. (2021).

Single - beam dual - color alternate - pathway two - photon spectroscopy: Toward an optical toolbox for redox biology. *Journal of Raman Spectroscopy*, 52(9), 1552-1560. DOI: 10.1002/jrs.6183

6. **Kostyuk, A. I.***, Tossounian, M.-A.*, Panova, A. S., Thauvin, M., Raevskii, R. I., Ezeriņa, D., Wahni, K., Van Molle, I., Sergeeva, A. D., Vertommen, D., Gorokhovatsky, A. Y., Baranov, M. S., Vriza, S., Messens, J., Bilan, D. S. & Belousov, V. V. (2022). Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo)hypohalous acids and their derivatives. *Nature Communications*, 13(1), 1-17. DOI: 10.1038/s41467-021-27796-2 (* - авторы внесли равный вклад в работу)

На диссертацию поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н. Савицкого Александра Павловича.

Отзыв **положительный**, принципиальных замечаний не содержит. Оппонент отмечает, что в обзоре литературы следовало уделить больше внимания радиометрическим сенсорам, основанным на конформационных равновесиях различных состояний протонирования хромофора. Он также обращает внимание на то, что раздел методов содержит некоторое количество неточностей, при этом в ряду случаев соискатель использует лабораторный сленг. Оппонент перечисляет ряд замечаний, требующих пояснения: 1. При обсуждении бимолекулярных кинетических констант имело бы смысл оценить различия в коэффициентах диффузии и ориентационный фактор, что возможно прояснило бы некоторые различия. 2. При указании значения кинетических констант в литературном обзоре и в целом в тексте автор почему-то использует математический знак «приблизительно» (~), в то время как при описании полученных данных используются нормальные доверительные интервалы. В чем смысл? 3. В некоторых местах (например, на странице 53) используется термин “краска”, вместо краситель. 4. На рисунках 32 В и Г (рисунок 3Б в автореферате) неправильно подписана ось абсцисс (написано «длина волны» вместо мольного соотношения). 5. В тексте диссертации и автореферата необходимо указать (не догадываться), что положение Cys355 соответствует Cys106, в данном случае нумерация по полной последовательности сенсора в котором pemR расположен на С-конце флуоресцентного белка.

Отзыв официального оппонента д.б.н. Соколова Алексея Викторовича. Отзыв **положительный**, принципиальных замечаний не содержит. Оппонент отмечает, что в разделе методов отсутствуют электрофореграммы очищенных препаратов белков, а также недостаточно четко указаны источник, чистота и способ определения активности используемых препаратов миелопероксидазы. Он также приводит список вопросов, требующих пояснения:

1. В диссертационной работе были использованы термины «гипогалогенные» (стресс и кислоты) вместо терминов «галогенирующий стресс» и «гипогалоидные кислоты» из русскоязычного обзора Панасенко О.М. и соавт. 2013 года, цитируемого автором в

англоязычном варианте [637]. Практически во всех реакциях с биополимерами участвует именно молекулярная форма хлорноватистой кислоты, а не с гипохлорит, а существенная часть HOCl , генерируемой в нейтрофилах, реагируя с таурином, превращается в N-хлорамин таурина, что не вполне соответствует термину “типогалогенный”. Чем руководствовался диссертант при выборе термина “типогалогенный”? 2. Какие выходы биосенсора, в микрограммах с чашки Петри или миллиграммах из литра среды LB, были получены при экспрессии с помощью протоколов, описанных в разделе 2.3? Выявлены ли преимущества для экспрессии или очистки биосенсора у одного из штаммов (Shuffle®T7 и XL1-Blue)? 3. Под контролем какого промотора была экспрессия Нурocrates при трансфекции культуры клеток HeLa Kyoto? Возможна ли количественная характеристика продукции активных форм (псевдо)галогенов нейтрофилами в наномолях оксиданта на клетку? 4. Проводилась ли оценка токсичности и иммуногенности белкового биосенсора при экспрессии в клетках или мальках *Danio rerio*?

Отзыв ведущей организации. Отзыв **положительный**, содержит следующие вопросы:

1. Хотелось бы узнать комментарий автора для каких клеток, кроме нейтрофилов, разработанный биосенсор будет эффективен в использовании. 2. Можно ли и имеет ли смысл иммобилизовать биосенсор Нурocrates на поверхности клеток для исследования выхода (псевдо)типогалогенных кислот в окружающую среду? Например, таким образом можно было бы наблюдать изменение уровней этих лигандов при поглощении бактериальных клеток нейтрофилами со стороны нейтрофилов.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы: редокс-биология, метаболизм активных форм (псевдо)галогенов, флуоресцентная микроскопия, разработка новых аналитических технологий на основе флуоресцентных белков, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих научных международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы, а также высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что в рамках исследований, проведенных соискателем, был разработан первый в мире генетически кодируемый сенсор для регистрации (псевдо)типогалогенных кислот и их производных (Нурocrates) на основе желтого флуоресцентного белка и бактериального транскрипционного репрессора NemR. Свойства полученного инструмента были детально охарактеризованы *in vitro*. Показано, что его ответ является достаточно селективным, быстрым и обратимым. Описаны

кинетические параметры сенсора в отношении целевых аналитов, а также установлена роль ряда аминокислотных остатков (Cys355 и Lys424) в их узнавании. Соискатель также охарактеризовал поведение индикатора в буферах с различными значениями pH. В рамках работы была расшифрована пространственная структура одного из вариантов Hurocrates (Cys355Ser) методом рентгеноструктурного анализа. Исследование полученной информации позволило предположить механизм, посредством которого происходит сопряжение сенсорного и репортерного доменов белка. Разработанный индикатор был также охарактеризован в эукариотической модели экспрессии на линии клеток HeLa Kyoto. При помощи Hurocrates соискателю удалось зарегистрировать динамику (псевдо)гипогалогенных кислот в цитоплазме бактерий, фагоцитируемых первичными нейтрофилами человека. Кроме того, сенсор был задействован в модели ампутации хвостового плавника мальков *Danio rerio*, что позволило подтвердить гипотезу о том, что регион раны является зоной повышенной продукции активных форм (псевдо)галогенов.

Теоретическая значимость исследования состоит в расширении современных представлений о метаболизме (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных, а также о биохимических свойствах генетически кодируемых сенсоров. Более детально она может быть охарактеризована в нескольких положениях. Во-первых, впервые в литературе была описана динамика (псевдо)гипогалогенного стресса в клетках живых бактерий, оказавшихся в полости фагосомы лейкоцита. До этого подобные работы проводили при помощи менее селективных методов или же подходов со значительно уступающим пространственно-временным разрешением. Во-вторых, данные, полученные на модели ампутации хвостового плавника *Danio rerio*, являются подтверждением гипотезы о том, что градиент пероксида водорода, возникающий в области раны и служащий для привлечения иммунных клеток, элиминируется путем конверсии в HOCl и родственные соединения. До настоящего момента были опубликованы лишь косвенные аргументы в пользу такой схемы. В-третьих, Hurocrates демонстрирует необычно высокую чувствительность к галаминам. Вещества с подобными свойствами не были описаны в литературе. Наконец, расшифровка пространственной структуры сенсора проливает свет не только на механизм его функционирования, но и на механизм функционирования других инструментов со схожим строением. Это открывает возможности по их рациональной оптимизации.

Практическая значимость исследования заключается в том, что Hurocrates представляет собой готовый аналитический инструмент, который дополняет современный арсенал редокс-биологов. Он может быть использован в широком круге работ: изучение взаимодействия патогенов и иммунной системы, поиск модуляторов активности

миелопероксидазы, исследование патогенеза социально-значимых заболеваний с воспалительной компонентой.

Достоверность результатов работы сомнений не вызывает: исследования проводили с использованием современных молекулярно-генетических, биохимических, клеточно-биологических и оптических методов; данные получены с использованием сертифицированного оборудования. Многие результаты экспериментов были воспроизведены коллегами соискателя в независимых лабораториях. Результаты исследований обрабатывали с использованием известных статистических подходов при помощи современных программных пакетов. Материал, представленный в работе, опубликован в зарубежных рецензируемых научных журналах.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, литературном поиске, сборе данных, разработке новых экспериментальных методик, интерпретации полученных результатов, участии в апробации результатов исследования на российских и международных конференциях, подготовке публикаций. Соискатель лично осуществил подавляющее большинство экспериментальных процедур, описанных в тексте диссертации, за исключением измерения кинетических свойств белков и расшифровки пространственной структуры сенсора (выполнены в лаборатории профессора Joris Messens, Брюссель, Бельгия), а также опытов на модели *Danio rerio* (выполнены в лаборатории профессора Sophie Vrız, Париж, Франция). Однако, в данных случаях он активно принимал участие в планировании исследований, а также анализе полученных результатов. При проведении экспериментальных работ соискателю оказывали помощь и поддержку Панова А.С., Сергеева А.Д., Раевский Р.И., Баранов М.С., Гороховатский А.Ю.

Диссертационный совет 24.1.037.01 постановил, что диссертационная работа Костюка Александра Игоревича является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена научно-практическая задача разработки генетически кодируемого сенсора для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных, что вносит существенный вклад в развитие исследований в области молекулярной биологии, биохимии, физиологии и медицины. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты, а по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Таким образом диссертационная работа **Костюка Александра Игоревича** “Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров”, 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 Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации 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).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Как различаются в клетке концентрации хлорид-аниона и тиоцианат-аниона? Есть ли биологический смысл в изучении процессов с участием тиоцианат-анионов?

2. Поступает ли ион тиоцианата в организм исключительно экзогенно, или же организм умеет его производить?

3. Взаимодействие разработанного сенсора с лигандами основано на образовании ковалентной связи. Чем обеспечивается разрыв данной связи? Насколько это надежная реакция?

4. Расшифрованная структура сенсора не выявляет образования ковалентной связи. Показана цепь водородных связей, соединяющая ключевой остаток с хромофором. Как это соотносится с молекулярным механизмом ответа?

5. Разработанная модельная система работает достаточно устойчиво как *in vitro*, так и на клетках. Сенсор отвечает на изменение концентрации лиганда, его сигнал способен возвращаться к исходным значениям. При этом в системе, где ответ завязан на образовании нескольких водородных связей, возникают проблемы с устойчивостью. Например, за водородные связи могут конкурировать молекулы воды. Не должен ли механизм ответа быть более робастным?

Соискатель Костюк А.И. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

1. Несмотря на то, что концентрации хлорид-анионов на порядки превышают концентрации тиоцианат-анионов, ферменты, которые производят (псевдо)гипогалогенные кислоты, обладают такими кинетическими свойствами, что они преимущественно взаимодействуют именно с тиоцианат-анионами. Так, по результатам кинетических моделирований, миелопероксидаза и эозинофильная пероксидаза производят до 50% гипотиоцианата в пересчете на прореагировавший пероксид водорода, а лактопероксидаза производит преимущественно гипотиоцианат-анион. Также следует понимать, что концентрации тиоцианат-аниона сильно зависят от диеты. Например, в тех странах, где в качестве одного из источников углеводов используют маниок, содержащий высокие количества цианогенных гликозидов, у населения сильно повышена концентрация тиоцианата в крови. Соответственно, будет повышена и концентрация гипотиоциановой кислоты. Аналогичное явление происходит у курильщиков. Если

говорить о важности изучения метаболизма гипотиоциановой кислоты, то показано, что она играет огромную роль, например, при развитии атеросклероза.

2. По большей части тиоцианат производится самим организмом. Это происходит путем нейтрализации токсичного цианида, поступающего в организм при потреблении цианогенных гликозидов, при помощи фермента роданазы.

3. Образование ковалентной связи было показано для транскрипционного фактора NemR в работах Gray и соавторов. Наши результаты свидетельствуют о том, что сенсор не полагается на образование сульфенамидной связи, однако, для его функционирования необходим ключевой цистеин. Таким образом, мы предполагаем, что работа сенсора основана исключительно на его окислении. Сначала происходит формирование связи S-Cl, после чего она гидролизуется до сульфеновой кислоты. Что же касается обратимости, то мы видим ее при обработке сенсора DTT и на клеточной модели HeLa Kyoto. Скорее всего в данных условиях сенсор восстанавливается под действием глутаредоксинов или же тиоредоксинов. Однако, данный вопрос следует проверять экспериментально. Мы продолжаем сотрудничать с коллегами из лаборатории профессора Joris Messens, которые умеют тестировать антиоксидантные системы *in vitro*, и сейчас они пытаются понять, какая из них лучше взаимодействует с сенсором.

4. Следует понимать, что структура была установлена для инактивированной версии сенсора. Расшифровать структуру исходного сенсора не удалось ввиду неудовлетворительных параметров соответствующих кристаллов. Что же касается механизма ответа, то общая идея состоит в следующем. Когда окисляется ключевой остаток цистеина, это неизбежно будет влиять на распределение электронной плотности в системе. В свою очередь, это будет влиять на конформацию подвижной петли, на расстояния между сопрягающимися аминокислотными остатками, на микроокружение хромофора. Там достаточно небольших изменений, чтобы у него изменялись квантовый выход флуоресценции или параметр pKa.

5. В качестве примера можно рассмотреть сенсор roGFP на редокс-статус глутатиона. Это один из немногих редокс-сенсоров, для которых были получены кристаллы и в окисленном, и в восстановленном состояниях. При том, что roGFP отвечает в разы, у него очень большой ответ, если сравнивать его структуры, то изменения будут минимальными. То есть, достаточно небольших сдвигов цепей относительно друг друга, чтобы в хромофоре изменилась электронная плотность. Конечно, хотелось бы получить кристаллы самого сенсора в окисленном и в восстановленном состояниях, но это пока не получается.

На заседании 15 февраля 2023 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по разработке генетически кодируемого сенсора для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных, имеющей важное значение для исследований в области молекулярной биологии, присудить Костюку Александру Игоревичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 6 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 – Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 20, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Зам председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

15.02.2023 г.

