



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,  
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: [isinfo@imb.ru](mailto:isinfo@imb.ru)  
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001



«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор ИМБ РАН  
академик

С.Г. Георгиева  
2023 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

на диссертационную работу **Костюка Александра Игоревича** «Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

**Актуальность темы**

За последние десятилетия генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры прочно заняли свое место в современном арсенале аналитической биохимии. По сравнению с классическими подходами их основным преимуществом выступает возможность *in vivo* визуализации молекулярных процессов в режиме реального времени. Кроме того, подобные инструменты не требуют травматичной загрузки в ткани животных и могут быть проэкспрессированы почти в любых клетках, а также субклеточных компартментах интереса. Особую роль данная технология играет в сфере редокс-биологии, поскольку соединения, традиционно изучаемые в данной области, являются крайне реакционноспособными и демонстрируют малые времена жизни. Поэтому их изоляция и детекция классическими методами сопряжены с большим количеством артефактов. На текущий момент в литературе описано огромное количество редокс-сенсоров, позволяющих исследовать различные показатели: концентрацию пероксида водорода, окислительно-восстановительный статус низкомолекулярных тиолов, соотношение  $NAD^+/NADH$  и  $NADP^+/NADPH$ . Однако, до сих пор не были разработаны индикаторы, которые были бы специфичными в отношении (псевдо)гипогалогенных кислот.

(Псевдо)гипогалогенные кислоты представляют собой неорганические соединения с общей структурой по типу  $\text{HOX}$ , где X соответствует атому галогена или псевдогалогенной группе. Их основными физиологическими представителями являются  $\text{HOCl}$ ,  $\text{HOBr}$  и  $\text{HOSCN}$ . В норме данные молекулы используются для борьбы с болезнетворными микроорганизмами, однако, в патологическом контексте они вызывают окислительный стресс, нарушающий функционирование собственных тканей организма. Убедительно доказано, что подобные процессы лежат в основе множества заболеваний человека – в том числе коронарных синдромов и нейродегенеративных болезней. Однако, наши представления о конкретной роли (псевдо)гипогалогенного стресса в патогенезе данных состояний крайне фрагментарны. Во многом это связано как раз с недостатками традиционных аналитических техник. Таким образом, разработка генетически кодируемого сенсора, который бы позволил визуализировать (псевдо)гипогалогенный стресс в режиме реального времени на субклеточном уровне оказывается крайне актуальной задачей.

### **Содержание диссертации**

Диссертация Костюка А. И. построена по традиционному плану и включает в свой состав следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список цитированной литературы, включающий 695 источников. Работа изложена на 230 страницах, содержит 46 рисунков и 5 таблиц.

Во “Введении” автор детально характеризует актуальность выбранной темы, описывает цели и задачи, которые были поставлены в рамках работы. Он также кратко обобщает теоретическую и практическую значимость полученных результатов, степень их обоснованности.

“Обзор литературы” начинается с описания химических свойств (псевдо)гипогалогенных кислот, а также их источников в организмах позвоночных. Автор приводит сравнительную характеристику соединений данного класса, после чего обсуждает конкретные механизмы, посредством которых они повреждают клетки. Далее, он описывает основные аналитические методы, разработанные для оценки степени (псевдо)гипогалогенного стресса, отмечает их преимущества и недостатки. Изложенная информация позволяет читателю сформировать представление о том, почему разработка генетически кодируемого сенсора для визуализации обсуждаемых окислителей является актуальной научной задачей. Обсуждение генетически кодируемых индикаторов начинается с раздела, посвященного флуоресцентным белкам, которые служат репортерными модулями соответствующих инструментов. Автор обобщает сведения об их разнообразии, химических и физических свойствах, факторах, влияющих на оптические

параметры. Далее, он приводит классификацию генетически кодируемых сенсоров и перечисляет основные принципы, которые лежат в основе их разработки и функционирования. Основной упор при этом сделан на тех инструментах, которые используются для визуализации редокс-параметров. “Обзор литературы” написан грамотным научным языком, прекрасно проиллюстрирован и в полной мере описывает теоретическую базу диссертационного исследования.

Раздел “Материалы и методы” содержит всю необходимую информацию об экспериментальных процедурах, осуществленных в рамках работы. Она изложена достаточно полно, четко и однозначно. Следует отметить, что в исследовании был задействован широкий арсенал как современных, так и классических подходов: сборка генетических конструкций, очистка рекомбинантных белков, флуоресцентный анализ, флуоресцентная микроскопия, работа с клеточными линиями и первичными культурами, эксперименты на модельном объекте *Danio rerio*. Все это подчеркивает высокий уровень методической подготовки Костюка А. И.

В разделе “Результаты и обсуждение” автор описывает разработку генетически кодируемого сенсора для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных (Нурocrstes), исследование его физико-химических свойств, а также использование в биологических моделях различной сложности. Полученный инструмент был детально охарактеризован *in vitro*. Показано, что он достаточно селективно и обратимо взаимодействует со всеми (псевдо)гипогалогенными кислотами, а также их реакционноспособными производными (хлораминами). Сигнал белка устойчив к обработке широкой панелью активных окислителей за исключением пероксинитрита. Было исследовано поведение инструмента в буферах с различным показателем pH, а также установлено, что его оптические свойства зависят от кислотности среды, из чего следует необходимость сочетания Нурocrates с грамотными pH-контролями. Полученный сенсор обладает удовлетворительными кинетическими свойствами и, соответственно, способен конкурировать с клеточными мишенями за целевые аналиты. При этом он демонстрирует необычно высокую константу скорости взаимодействия с хлораминами, что представляет собой самостоятельный научный интерес. Автору также удалось до некоторой степени прояснить механизм функционирования индикатора. Так, при помощи мутационного анализа он показал, что в отличие от исходного транскрипционного фактора NemR, Нурocrates не полагается на образование сульфенамидной связи. Для развития оптического ответа достаточно окисления ключевого остатка Cys355. Соответственно, бесцистеиновая версия сенсора, НурocratesCS, может быть использована в качестве инактивированного контроля с целью детекции артефактов измерений. Совместно с коллегами автору удалось

расшифровать пространственную структуру HurocratesCS методом рентгеноструктурного анализа. Это позволило предположить конкретный механизм, посредством которого конформационные изменения в сенсорной части инструмента передаются хромофорному окружению репортерного модуля.

Hurocrates функционален в эукариотических моделях экспрессии, что было доказано на примере линии HeLa Kyoto. При этом в данных условиях он взаимодействует с антиоксидантными системами клетки, которые возвращают его сигнал к исходным значениям в течение 5-10 минут. Таким образом, полученный инструмент подходит для многократной регистрации актов окисления/восстановления. При помощи Hurocrates автору также удалось визуализировать динамику (псевдо)гипогалогенного стресса, с которым сталкиваются бактерии, оказавшиеся в полости фагосомы нейтрофила. Показано, что ответ инструмента развивается с первых же моментов после поглощения микроорганизма и выходит на плато в течение двух минут. Наконец, Hurocrates был использован в модели *in vivo* в мультипараметрическом режиме с красным сенсором пероксида водорода HyPerRed. Установлено, что ампутация хвостового плавника мальков *Danio rerio* приводит к развитию (псевдо)гипогалогенного стресса, при этом концентрация активных форм галогенов в ткани остается высокой как минимум на протяжении часа после проведенной операции.

“Заключение” и “Выводы” сформулированы четко. Они лаконично обобщают суть проделанной работы и полностью соответствуют поставленным задачам.

### **Научная новизна, теоретические и практическое значение исследования**

Наиболее важным практическим результатом, полученным в рамках диссертации, является разработка принципиально нового аналитического инструмента для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных. В отличие от аналогов Hurocrates сочетает в себе относительно высокую селективность, обратимый и ратиометрический характер ответа, а также замечательные кинетические параметры. Поскольку Hurocrates является белковой молекулой, он может быть задействован в системах различного уровня сложности – от условий *in vitro* до модельных объектов *in vivo*. При этом в последнем случае отсутствуют проблемы, связанные с травматичной доставкой агента в ткани или же с его вытеканием из клеток. Можно ожидать, что Hurocrates окажется востребованным в различных сферах исследования воспалительных процессов: поиск терапевтических агентов, изучение взаимодействия патогенов и иммунной системы, визуализация редокс-событий при развитии хронических заболеваний.

Среди полученных результатов можно выделить несколько, обладающих особой теоретической значимостью. Во-первых, необычные кинетические параметры Нурocrates в отношении хлораминов поднимают вопрос о том, в какой мере белковое окружение реакционных мишеней способно влиять на их взаимодействие с соответствующими окислителями. Вполне возможно, что в природе существуют другие полипептиды с подобными свойствами. Во-вторых, расшифровка пространственной структуры НурocratesCS проливает свет не только на механизм его функционирования, но и на механизм функционирования других инструментов со схожим строением. Это открывает широкий простор возможностей по их совершенствованию. В-третьих, в настоящей работе визуализирована динамика (псевдо)гипогалогенного стресса в цитоплазме живых бактерий, оказавшихся в полости фагосомы нейтрофила. До сих пор подобные исследования проводили при помощи косвенных методов или же недостаточно селективных инструментов. Наконец, автору удалось показать, что регион ампутации хвостового плавника *Danio rerio* является очагом (псевдо)гипогалогенного стресса. Это служит еще одним подтверждением гипотезы о том, что градиент пероксида водорода, участвующий в привлечении лейкоцитов в область повреждения, элиминируется в ходе активности миелопероксидазы.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов**

Результаты, описанные в диссертационной работе, получены при помощи широкого арсенала актуальных методов биохимии и клеточной биологии, при этом во всех случаях приведены убедительные контроли. Размеры выборок являются достаточными и соответствуют стандартам, принятым в соответствующих областях науки. Для интерпретации количественных данных были задействованы грамотные статистические подходы, реализованные на базе современных программных пакетов.

Результаты диссертационной работы представлены в 6 статьях, опубликованных в международных рецензируемых журналах. Среди них присутствуют такие известные издания как “Free Radical Biology and Medicine” и “Nature Communications”. Автор также выступал с полученными данными на 3 международных и российских конференциях. Таким образом, научные положения и выводы, изложенные в тексте диссертации, являются обоснованными в достаточной мере и не вызывают сомнений.

### **Замечания и вопросы**

- Хотелось бы узнать комментарий автора для каких клеток, кроме нейтрофилов, разработанный биосенсор будет эффективен в использовании.

- Можно ли и имеет ли смысл иммобилизовать биосенсор Нурocrates на поверхности клеток для исследования выхода (псевдо)гипогалогенных кислот в окружающую среду? Например, таким образом можно было бы наблюдать изменение уровней этих лигандов при поглощении бактериальных клеток нейтрофилами со стороны нейтрофилов.

Эти замечания не носят принципиального характера и не подвергают сомнению корректность сделанных в диссертации выводов.

## Заключение

Работа Костюка А. И. “Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров” представляет собой целостное и завершённое исследование, выполненное на высоком методологическом уровне. Она 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; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности “Молекулярная биология” – 1.5.3.

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, заслушана, отзыв на нее заслушан и утвержден на объединенном научном семинаре профильных лабораторий ИМБ РАН 18 января 2023 г., протокол №1.

Отзыв на диссертационную работу Костюка А. И. подготовлен главным научным сотрудником ИМБ РАН Митькевичем Владимиром Александровичем.

Доктор биологических наук  
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология,  
член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория конформационного  
полиморфизма белков в норме и патологии

В.А. Митькевич

119991, г. Москва, ул. Вавилова 32,  
Рабочий телефон +7(499)1359824  
e-mail: mitkevich@gmail.com

Подпись В.А. Митькевича заверяю  
Ученый секретарь ИМБ РАН, к.в.н.



А.А. Бочаров