

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Шохиной Арины Геннадиевны** «Генетически кодируемый индикатор для регистрации редокс-статуса пула глутатиона на основе красного флуоресцентного белка mCHERR», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Изучение отдельных клеток является актуальной задачей, на решение которой направлены усилия в области клеточной и молекулярной биологии и биохимии. В связи с этим возникла потребность в создании новых сенсоров на редокс-состояние клетки для мониторинга пула глутатиона в живых клетках. Среди таких сенсоров особо стоит выделить генетически кодируемые редокс-сенсоры, которые являются химерными белками, состоящими из флуоресцентного домена и глутатион зависимого домена. Преимуществами генетически кодируемых индикаторов является возможность их экспрессии в определенных компартментах клетки, таких как цитоплазма, эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Генетически кодируемые редокс индикаторы позволяют наблюдать за активностью живых клеток и организмов в течение длительного времени, возвращаясь к ним по мере необходимости, и одновременно изучать зависимость редокс статуса клеток в зависимости от поведения животного в норме и патологии.

Несмотря на все вышеперечисленные достоинства, разработанные к настоящему времени редокс сенсоры имеют ряд недостатков. Прежде всего появилась необходимость в разработке индикатора, специфически отражающего редокс-статус пары 2GSH/GSSG и обладающего спектральными характеристиками красного флуоресцентного белка. Свет с большей длиной волны, применяемый для возбуждения флуоресценции красных белков, менее токсичен для клеток. Кроме того, аутофлуоресценция биологических объектов в красном канале регистрации флуоресценции значительно ниже по сравнению с зеленым. Кроме этого, в последнее время во многих случаях появилась необходимость как проведения многопараметрических измерений с использованием различных сенсоров в различных спектральных диапазонах, так и с переносом этих методов на животных, где оптическое окно для глубокого проникновения света в ткань животного находится в красной области спектра. В этой связи бесспорно актуальна тема диссертационной работы Шохиной Арины Геннадиевны, посвященной созданию новых генетически кодируемых редокс индикаторов для мониторинга изменения редокс-статус пары 2GSH/GSSG. Автором предложены несколько новых вариантов создания генетически кодируемых редокс индикаторов.

Диссертационная работа Шохиной А.Г. построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 120 страницах печатного текста и включает 30 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы содержит 351 ссылку, включая оригинальные статьи, обзоры литературы и современные работы 2019 года.

В разделе «Введение» обоснованы актуальность и выбор темы исследования, сформулирована цель и задачи работы, отражены теоретическая и практическая значимость работы и ее новизна.

В обзоре литературы подробно разобраны особенности редокс-статуса различных клеточных компартментов, а также редокс статуса клеток на разных стадиях клеточного цикла. Подробно разобраны особенности функции глутатиона, связанные не только с поддержанием редокс статуса клетки, но и с участием в различных биохимических процессах, как энзиматической так и не энзиматической природы. Особый интерес представляет описание глутатионилирования как механизма защиты и регуляции SH-содержащих белков.

Подробно описано большинство разработанных на настоящий момент редокс индикаторов как химических соединений, так и генетически кодируемых, их преимущества и недостатки. Раздел посвященный цветным белкам четко сфокусирован на описании особенностей цветных белков, например пермутации, позволяющих создавать на основе них сенсорные конструкции на редокс состояние клеток. Описаны основные принципы конструирования редокс индикаторов и задачи, которые удалось решить с их помощью в различных модельных объектах *in vivo*. Обзор литературы написан ясно, хорошим научным языком, широко охватывает материал, включая самые современные публикации, и дает полное представление о проблемах и задачах в данной области исследований.

В разделе «Материалы и методы» подробно и грамотно описаны используемые в работе методики. Автор демонстрирует использование широкого арсенала современных методов биохимии, молекулярной и клеточной биологии, такие как: молекулярное клонирование, выделение и очистка рекомбинантных белков, выделение и культивирование нейронов мыши, флуоресцентная спектроскопия и прижизненная микроскопия клеток млекопитающих, эмбрионов и мальков *D.rerio*. Статистическая обработка и анализ изображений проводились современными программными пакетами. Методический уровень диссертации, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Глава «Результаты и обсуждение» разделена на три части. Первая часть посвящена разработке и характеристике редокс индикатора Grx1-roCherry. Для получения этого индикатора была использована классическая схема, ранее реализованная на зеленых и желтых флуоресцентных белках и апробированная на трех наиболее ярких флуоресцентных белках mCherry, mRuby2 и mKate2. В указанные белки были введены пары аминокислотных остатков цистеина так, чтобы они оказывались в непосредственной близости друг к другу на соседних β -листах в максимальной близости к хромофору флуоресцентного белка. Это делалось для того, чтобы при образовании дисульфидного мостика вызвать значимые изменения конформации в области хромофора и таким образом изменить его флуоресцентные характеристики. Для улучшения кинетических свойств сенсора, также как и в случае зеленых белков, с N-конца через оптимизированный линкер был присоединен глутаредоксин-1 человека (Grx-1). Окончательный вариант индикатора был получен после анализа 12 различных конструкций с тремя указанными красными белками и различающимися по положению парами остатков цистеинов в них. Тестирование в суспензии клеток *E.coli*, экспрессирующих полученные версии, при добавлении пероксида водорода показало, что в конструкции на основе белка mRuby2 не наблюдалось изменений во флуоресцентном сигнале, в то время как на основе mKate2 сигнал уменьшался на 10%, а в случае 2-х различных версий mCherry увеличивался на 10-15%. Тестирование на клетках млекопитающих показало, что только одна из отобранных версий Grx1-mCherry-A150C/K203C давала заметный обратимый отклик, который удалось повысить за счет введения в последовательность дополнительного аминокислотного остатка после Cys150. Были проанализированы все возможные аминокислотные вставки и отобрана наиболее эффективная вставка Thr. Дополнительная мутация Ser сразу после этой вставки на Glu привела к увеличению динамического диапазона сигнала до 45%. Эта конструкция была названа Grx1-roCherry.

Во второй части главы «Результаты и обсуждение» диссертационной работы Шохиной А.Г. описаны спектральные и физико-химические характеристики полученного сенсора. Показано, что очищенный препарат сенсора не окисляется пероксидом водорода напрямую, окисление происходит только в присутствии окисленного глутатиона. Отмечено значительное понижение коэффициента экстинкции белка mCherry в составе сенсора по сравнению с исходным белком. Изучена зависимость флуоресценции очищенного белка Grx1-roCherry от pH, значение pKa составляет 6,7. Поэтому в диапазоне физиологических значений pH 6,0-8,0 интенсивность его флуоресценции изменяется всего в 4 раза, по сравнению с ранее полученными сенсорами типа gxRFP это изменение составляло порядка 20 раз. Проверена специфичность сенсора и показано, что в области

физиологических концентраций заметный перекрест дает оксид азота и то, только в области больших концентраций, поэтому на живых клетках автор вполне резонно рекомендует проводить контроль с использованием блокаторов NO-синтаз. Существенное влияние оказывают также условия гипогалогенного стресса, при котором образуется N-хлортаурин. Все эти данные были получены в параллели с хорошо известным сенсором Grx1-roGFP2 и показали хорошую корреляцию между сенсорами. Определен редокс-потенциал сенсора Grx1-roCherry и показано, что этот сенсор на основе красного белка окисляется легче зеленого Grx1-roGFP2.

В третьей части главы «Результаты и обсуждение» диссертационной работы Шохиной А.Г. описаны результаты по применению данного сенсора в живых клетках и организмах. Автор удачно применил мультипараметрический метод измерений с использованием красного и зеленого сенсора и различных сигналов внутриклеточной локализации. Ему удалось показать, что редокс-состояние цитоплазмы и митохондрий меняется по-разному при развитии окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода. Аналогично, в условиях гипоксии редокс-состояние цитоплазмы не изменяется, в то время как в митохондриях происходят значительные изменения. При одновременном использовании сенсора Grx1-roCherry и SoNar для детекции НАДН на двух клеточных линиях, опухолевой HeLa Kyoto и эмбриональной НЕК293, было показано возможность использования данной пары сенсоров для контролируемого переключения метаболизма клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование. Автор также продемонстрировал возможность применения сенсора Grx1-roCherry *in vivo* на модели двухдневной личинки *D.rerio*. Таким образом, все поставленные в работе задачи успешно решены.

Материалы диссертационной работы Шохиной А.Г. опубликованы в шести статьях в международных рецензируемых журналах и представлены в 2 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

В диссертационной работе представлен значительный по объему, новизне, теоретической и практической значимости материал. Достоверность описанных в диссертации результатов не вызывает сомнений. Результаты диссертации полностью отражены в публикациях автора, содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы.

Из замечаний можно отметить недостаточную изученность механизмов изменения флуоресценции красных белков в разработанных автором индикаторах. Так, например, следовало бы изучить *in vitro* pH-зависимость сенсора Grx1-roCherry в окисленном состоянии и сопоставить с исходным белком, поскольку измеренное автором значение рК

6,7 для хромофора резко отличается от 4,5 для исходного белка. Поэтому, наиболее вероятно, что значительное уменьшение коэффициента экстинкции в сенсоре при фиксированном значении рН 7 является кажущимся, а окисление цистеинов в структуре Grx1-goCherry может привести к обратному смещению рК в кислую область и увеличить кажущийся коэффициент экстинкции. Дополнительно картину могло бы прояснить измерение времен жизни, так как оно должно по-разному проявиться при изменении степени протонирования хромофора, в этом случае время жизни не должно изменяться, и при изменении подвижности хромофора, приводящей к безизлучательной дезактивации. В этом случае должно произойти изменение времени жизни. Понимание этих механизмов могло бы способствовать более рациональному выбору стратегии мутагенеза в области хромофора.

Высказанные замечания не умаляют значения полученных в работе результатов. По всем критериям данная работа отвечает 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 сама диссертантка несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология – 03.01.03.

Официальный оппонент
заведующей лабораторией
физической биохимии ФГУ
«Федеральный исследовательский центр
Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
доктор химических наук, профессор

Александр Павлович Савицкий

07.02.20

119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, корп. 2
Тел: +7 (495) 954-87-25
Email: pasavitsky@inbi.ras.ru

Подпись Савицкого А.П. удостоверяю

Ученый секретарь ученого совета
ФИЦ Биотехнологии РАН, к.б.н.



Орловский А.Ф.