

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук **Горбачева Дмитрия Андреевича**
на тему: «Новые генетически кодируемые фотосенсибилизаторы»
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность исследования

Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы — это фототоксичные флуоресцентные белки, которые отличаются от химических фотосенсибилизаторов тем, что они образуют значительно меньше активных форм кислорода и поэтому имеют более низкий уровень фототоксичности, однако не требуют непосредственного добавления к клеткам извне. Такие белки можно использовать для прицельной элиминации клеточных популяций, что особенно актуально, например, при фотодинамической терапии онкологических заболеваний. Однако возможности прицельного уничтожения клеток ограничены набором доступных на данный момент фототоксичных флуоресцентных белков разных цветов (всего несколько вариантов). В свете этого, настоящая работа, посвященная созданию нового генетически кодируемого фотосенсибилизатора, активируемого синим светом, и получению нового варианта белка SuperNova с увеличенной фототоксичностью, безусловно, является актуальным как для биомедицины, так и для фундаментальной науки.

Научная новизна исследования и практическая значимость работы

Полученные в ходе работы результаты отличаются высокой степенью научной новизны. Так, были получены новые генетически кодируемые фотосенсибилизаторы KillerOrange и mKillerOrange, активируемые синим светом. Автор показал, что KillerOrange не уступает по фототоксичности широко используемому белку KillerRed. Помимо этого, в ходе работ была обнаружена мутация S10R, способствовавшая повышению эффективности и скорости созревания и, как было показано, фототоксичности белков KillerRed и SuperNova. Было убедительно показано, что экспрессия генов новых фотосенсибилизаторов в клетках бактерий и млекопитающих с их последующим облучением приводят к гибели исследуемых клеточных популяций. Данные результаты, несомненно, значимы с практической точки зрения, так как позволят расширить возможности оптического контроля за функционированием белков и клеток, а также могут применяться для прицельного уничтожения как прокариотических, так и эукариотических клеток.

Содержание работы, степень обоснованности научных выводов и их достоверность

Диссертационная работа изложена на 90 страницах, построена по стандартному плану и содержит: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Выводы и Список цитируемой литературы, включающий 122 ссылки. В диссертации имеется 45 рисунков и 1 таблица.

Введение содержит сведения об актуальности, научной новизне и научно-практической значимости проведенного исследования. Сформулированы **цели и задачи исследования**, а также приведены опубликованные по теме работы статьи и доклады на конференциях.

Обзор литературы знакомит читателя с современным состоянием исследований в области создания и использования фотосенсибилизаторов; сделан акцент на фототоксичных флуоресцентных белках. Обзор литературы написан лаконично, однако содержит необходимую для понимания актуальности и результатов работы информацию. Обращает на себя внимание логика повествования от описания взаимосвязи структуры и функции в обычных флуоресцентных белках до рассмотрения соответствующих механизмов формирования фототоксичности. Так или иначе рассмотрены свойства всех описанных на сегодняшний день фототоксичных белков, описаны сферы их применения. Обзор хорошо проиллюстрирован (18 рисунков). После знакомства с обзором литературы необходимость получения новых вариантов фототоксичных белков, а, следовательно, и актуальность исследования, не вызывают сомнений.

Раздел «Материалы и методы» описывает широкий набор современных **методов и подходов** молекулярной и клеточной биологии, использованных в работе. Раздел включает описание метода клонирования по технологии Golden Gate, направленной эволюции исследуемых белков, описание разработанного в ходе работы метода определения фототоксичности полученных белков в бактериях и клетках млекопитающих, измерения скорости созревания хромофора *in vivo*, выделения рекомбинантных белков, измерения спектров поглощения и флуоресценции и других стандартных молекулярно-биологических процедур.

Результаты и обсуждение содержат 3 раздела.

Первый раздел описывает создание варианта KillerRed, который *не формирует* DsRed-подобный хромофор. Было показано, что внесение трех мутаций — I64L, D114G и T115S — приводит к образованию «классического» GFP-подобного хромофора и смещению максимума флуоресценции в коротковолновую область (514 нм).

Второй раздел содержит основные результаты по получению KillerOrange — оранжевого варианта KillerRed. Белок содержит 7 замен (G3C/Y66W/D113S/N145S/F177L/Y221H/E236Q), представляет собой ярко-оранжевый флуоресцентный белок с максимумом возбуждения при 512 нм и максимумом эмиссии при 555 нм. Было показано, что KillerOrange не уступает по фототоксичности KillerRed. Помимо этого, удалось получить мономерный вариант KillerOrange путем введения замены Y66W в белок SuperNova. По результатам проведенных исследований можно утверждать, что созданные новые фототоксичные белки KillerOrange и mKillerOrange, активируемые синим светом, могут быть использованы с KillerRed как вместе, так и независимо.

Третий раздел посвящен увеличению фототоксичности белков SuperNova и KillerRed. Путем внесения мутации S10R были получены белки SuperNova2 и KillerRed2, в которых хромофор созревает с большей эффективностью, что, в конечном итоге, привело к увеличению их фототоксичности. Были описаны спектральные характеристики новых вариантов белков, охарактеризовано их созревание *in vitro*, показано, что по фотостабильности они не уступают исходным вариантам белков, KillerRed и SuperNova. Были разработаны тесты на фототоксичность полученных белков в клетках млекопитающих и бактерий.

Все научные положения и выводы достоверны и обоснованы, полностью отражают полученные в работе научные результаты. В целом, работа выполнена на высоком научном и методическом уровне.

Тем не менее, как и практически любая научная работа, диссертационное исследование Горбачева Дмитрия Андреевича имеет ряд недостатков, а также вызывает вопросы, которые во многом связаны с интересом оппонента к тематике исследования и не умаляют значимости полученных результатов, а также не подвергают сомнению степень их достоверности.

Моменты, на которые хотелось бы обратить внимание:

Сильные стороны:

1. Проведено объемное исследование, в процессе которого возникали трудности и неудачи. Например, некоторые прицельно введенные мутации для модификации свойств хромофоров исследуемых белков не сработали и пришлось искать альтернативные замены (например, сработала замена Gyr66 только на Trp), а для поиска прототипного варианта с неоптимальными параметрами требовался скрининг 100 000 колоний клеток, а затем методичное улучшение его свойств. Однако диссертант смог преодолеть эти временные трудности, в результате чего все задачи исследования были выполнены.
2. Разработана простая, но весьма изящная методика оценки фототоксичности генетически кодируемых фотосенсибилизаторов, которая заключается в смешении клеток, экспрессирующих фотосенсибилизатор, с клетками, экспрессирующими нефототоксичный флуоресцентный белок, имеющий свечение в другом спектральном канале, с последующей оценкой соотношения интенсивности флуоресценции этих белков при разной дозе облучения светом, вызывающим фототоксичный эффект. Таким образом, вводится внутренний стандарт, который позволяет корректно оценивать кинетику гибели популяции клеток, экспрессирующих фотосенсибилизатор, в гетерогенной популяции клеток. Нет сомнений, что этот простой, но эффективный способ окажется полезным в других исследованиях.
3. Помимо получения и характеристики нового фотосенсибилизатора, отработан способ оценки эффективности созревания его хромофора, что важно с учетом предположенной автором взаимосвязи эффективности созревания хромофора и фототоксичности.

Вопросы и замечания:

1. Несмотря на то, что в работе обсуждается проблема олигомерного состояния флуоресцентных белков, например, в случае димерного KillerRed (или KillerOrange) или его мономерного варианта SuperNova (или mKillerOrange), само олигомерное состояние исследованных в работе белков не было изучено. Тем не менее, ввиду динамичности белок-белковых взаимодействий и того, что внутриклеточные условия среды могут провоцировать самоассоциацию олигомерных белков, проверка олигомерного состояния полученных белков даже в условиях *in vitro* было бы крайне полезной. Поскольку образование белок-белковых комплексов подчиняется закону действующих масс, концентрация белка сильно влияет на олигомерное состояние. Существует

множество случаев, когда заявленное олигомерное состояние белков поддерживается только в узком диапазоне концентраций, в свете чего исследование концентрационной зависимости олигомерного состояния было бы особенно информативным. Стоит особо отметить, что на стр. 36 диссертации автор делает предположение об олигомерном состоянии по расположению субъединиц в кристаллической решетке, что не совсем корректно по причине того, что при кристаллизации могут образовываться ложные или, наоборот, нарушаться биологически значимые интерфейсы, и один и тот же белок может кристаллизоваться и как димер, и как мономер.

2. Вызывает удивление разница в величине эффекта мутации S10R в составе KillerRed2 и SuperNova2 (которые заявлены как димерный и мономерный белки, соответственно) на эффективность созревания хромофора, яркость и фототоксичность исследуемых фотосенсибилизаторов. Обсуждается, что эта мутация расположена на периферии белка и, по-видимому, оказывает дальний эффект на свойства хромофора, однако легко предположить ее непосредственный эффект на самоассоциацию белка (например, на стабильность его димеров или мономеров). Может ли быть такое, что эффект замены S10R обусловлен влиянием на олигомеризацию белка?
3. Не очень понятно, почему при введении мутаций с целью блокирования водного канала фотосенсибилизаторов автор объясняет сходство эффектов мутаций I199F и I199L тем, что в обоих случаях введение объемного остатка блокирует водный канал. Если в случае I199F замены это более чем обоснованно, то замена I199L представляется синонимичной, поскольку изолейцин и лейцин являются изомерами.
4. При анализе строения флуоресцентных белков и мутаций, меняющих их свойства, ни в диссертации, ни в автореферате не приведены ссылки на соответствующие структуры в Protein Data Bank. Во-первых, получение пространственных структур представляет собой большой и ценный труд, который заслуживает указания идентификаторов PDB (и ссылок на статьи). Во-вторых, отсутствие указания таких идентификаторов затрудняет независимый анализ потенциального эффекта мутаций и особенностей строения исследуемых белков. Кроме того, для некоторых случаев описания эффекта мутаций (например, I199F и I199L), иллюстрации либо отсутствуют, либо не содержат обсуждаемых структурных элементов.
5. В работе указывается, что новый фотосенсибилизатор KillerOrange может быть не только независимо от своего предшественника KillerRed, но и вместе с ним быть использован для уничтожения нежелательных клеток. Можно ли предположить, будет ли эффект совместного использования KillerOrange и KillerRed простым аддитивным или синергичным и будет превышать сумму независимых эффектов белков?
6. В работе существует ряд опечаток, неправильных обозначений, стилистически неудачных конструкций и пунктуационных ошибок (примеры: аминоксилотных (с. 35), «Литературный обзор» (Автореферат), метеонин (с. 33), флуоресциин (с. 21), «Стереохимических состав канала точно определяет положение молекул воды **в нем**» (с. 25). На рис. 4 автореферата указано «Возбуждение при 600 нм» или «Эмиссия при 450 нм», что сбивает с толку, поскольку, по всей видимости, имеется в виду «спектр возбуждения при эмиссии при 600 нм» и «спектр эмиссии при возбуждении при 450 нм». На рис. 8 автореферата на оси Y указано «Отношение клеток с KillerOrange к клеткам EGFP» (вероятно, пропущено слово «числа»). В некоторых случаях использованы не

слишком удачные англицизмы (например, «референс» вместо «контроль» или «калибратор»). Нарушен порядок цитирования рисунков в тексте (Рисунок 13 на стр 27 цитируется сразу после рис. 9, но до рис. 10-12). На рис. 11 и 12 подпись оси X – «Время, нс» (должно быть – Длина волны, нм). Рис. 65 – «с увеличением возраста бактерий». Фраза не совсем понятна.

Приведенные замечания не умаляют значимости результатов и не подвергают сомнению выводы, сделанные в диссертации Горбачева Д.А.

Заключение

Диссертационная работа Горбачева Дмитрия Андреевича 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.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы белок-белковые взаимодействия, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

СЛУЧАНКО Николай Николаевич



10.06.2022

Контактные данные:

119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2
тел.: +7 (495) 660-34-30 доб. 147
e-mail: nikolai.sluchanko@mail.ru

Подпись д.б.н. Случанко Н.Н. заверяю
Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН
Кандидат биологических наук




ОРЛОВСКИЙ Александр Федорович