

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Горбачева Дмитрия Андреевича**
«Новые генетически кодируемые фотосенсибилизаторы»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Флуоресцентные белки, открытые в середине прошлого столетия, оказались фундаментально важным инструментом биологической науки. К настоящему времени получены десятки флуоресцентных белков различающихся по спектральным характеристикам и мультимерной организации, имеющих разное время жизни и фотостабильность, созревающих при разной температуре и с разной скоростью, способных к фотоактивации и фотопереключению. Это позволило создать широкий арсенал методов, незаменимых в современных биологических исследованиях. Далеко не полный список приложений, в которых используются флуоресцентные белки, включает: визуализацию живых клеток и субклеточных структур, многоцветную визуализацию экспрессии генов, проточную цитометрию, микроскопию сверхвысокого разрешения, а также целый ряд разнообразных биосенсоров. Однако, несмотря на триумфальное шествие флуоресцентных белков, работы по конструированию их новых вариантов активно продолжаются, что, с одной стороны, связано с неоптимальными свойствами существующих белков, а, с другой стороны, с возникновением новых областей их применения.

Одним из перспективных направлений является применение флуоресцентных белков в качестве фотосенсибилизаторов – молекул, способных генерировать активные формы кислорода при облучении светом, что может быть использовано для направленной инактивации специфических белков или для направленной индукции клеточной гибели. Принципиальной особенностью флуоресцентных белков, по сравнению с многочисленными низкомолекулярными флуоресцентными фотосенсибилизаторами, является возможность их нацеливания в определенный тип клеток либо в определенный компартмент клетки. Это делает флуоресцентные белки мощным инструментом для управления цитотоксичностью в точно контролируемом пространственно-временном режиме.

Известные сегодня фототоксичные белки делятся на две группы. К первой из них относятся фотосенсибилизаторы с экзогенным хромофором – генетически модифицированные белки, которые связывают органические молекулы, выступающие в качестве генераторов активных форм кислорода. Такие белки имеют относительно малый

размер, а также высокие фототоксичность и квантовый выход активных форм кислорода. Однако для их функционирования в большинстве случаев требуется экзогенное введение хромофора, что существенно усложняет работу с такими фотосенсибилизаторами. А, кроме того, наличие в биологической системе экзогенного хромофора приводит к заметному неспецифическому действию.

На этом фоне чрезвычайно перспективными выглядят, относящиеся к другой группе, GFP-подобные флуоресцентные белки, у которых фотосенсибилизатором является их собственный хромофор. Неспецифическое действие при использовании этих белков минимально, что позволяет применять их для создания прецизионных исследовательских инструментов. Однако фототоксичные белки этой группы обладают более низким квантовым выходом активных форм кислорода. Еще одной проблемой, ограничивающей применение белков-фотосенсибилизаторов в целом, является их недостаточное спектральное разнообразие.

Таким образом, получение вариантов с новыми спектральными характеристиками и с улучшенной фототоксичностью является в настоящее время наиболее актуальной задачей в области белковой инженерии фототоксичных флуоресцентных белков. Именно на решение этой задачи направлена диссертационная работа Д.А. Горбачева, посвященная созданию новых GFP-подобных фотосенсибилизаторов: белка, активируемого синим светом, и белков с увеличенной фототоксичностью.

Диссертационная работа написана по классическому плану, изложена на 90 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список литературы (включает 122 ссылки). Диссертация содержит 45 рисунков и 1 таблицу.

Во введении сформулированы актуальность темы диссертации, отражены научная новизна и практическая значимость работы.

Обзор литературы посвящен фотосенсибилизаторам. В нем рассмотрены различные типы фотосенсибилизаторов и их механизмы действия. Основной объем представленных в обзоре данных связан с генетически кодируемыми фотосенсибилизаторами, при этом акцент сделан на GFP-подобных фототоксичных белках. Большое внимание уделено структурно-функциональной организации этих белков и молекулярным детерминантам фототоксичности. Содержание обзора литературы хорошо соответствует экспериментальной части работы и, несомненно, важно для ее понимания. Обзор написан хорошим языком, отражает современное состояние исследований и позволяет лучше оценить значимость полученных автором диссертации результатов.

В разделе «Материалы и методы» диссертантом приведено достаточно подробное описание использованных в работе методов. Особое внимание уделено ключевым для работы методам тестирования фототоксичности белков и измерения скорости созревания хромофора. Очевидно, что автор на высоком уровне владеет использованными при выполнении диссертационной работы методами молекулярной биологии, биохимии и биофизики. Следует отметить также, что разработанный автором в ходе выполнения диссертационной работы новый количественный метод определения фототоксичности для культур клеток млекопитающих и бактерий позволяет эффективно сравнивать фототоксичность генетически кодируемых фотосенсибилизаторов и может найти широкое применение.

В разделе «Результаты и обсуждение», являющимся основной главой диссертации, можно выделить две части. Первая часть посвящена созданию белка KillerOrange – варианта белка KillerRed с измененными спектральными характеристиками. Для изменения спектральных характеристик KillerRed автором была проведена направленная модификации хромофора, а затем яркость полученного оранжевого варианта, KillerOrange, была существенно улучшена с помощью случайного мутагенеза. Полученный белок был детально охарактеризован, изучены его спектральные характеристики и фототоксичность. Введением точечной мутации был создан мономерный вариант KillerOrange – mKillerOrange. Кроме того, был проведен сайт-направленный мутагенез, который позволил получить новые данные о роли отдельных аминокислотных остатков в обеспечении фототоксичности. Основным результатом этой части работы является создание новых фототоксичных белков KillerOrange и mKillerOrange, которые активируются синим светом и могут быть использованы одновременно с KillerRed, например, для обеспечения селективного цитотоксического действия.

Вторая часть посвящена увеличению фототоксичности белков SuperNova и KillerRed – двух основных GFP-подобных фототоксичных белков существующих в настоящее время. Для решения задачи увеличения фототоксичности автором был применен оригинальный подход, основанный на увеличении эффективности созревания белков, а на увеличении коэффициента экстинкции и/или квантового выхода активных форм кислорода. Применение этого подхода позволило отобрать из библиотеки мутантов белка SuperNova вариант, несущий единичную аминокислотную замену S10R и характеризующийся существенно повышенной эффективностью созревания красного хромофора. Введение данной мутации в белок KillerRed привело к аналогичному эффекту. Новые улучшенные варианты флуоресцентных белков, получившие обозначения

SuperNova2 и KillerRed2, были детально охарактеризованы. Изучены их спектральные характеристики, скорость созревания *in vitro* и *in vivo*, фототоксичность по отношению к бактериям и клеткам млекопитающих, а также фотостабильность. Получение белков SuperNova2 и KillerRed2 является принципиальным результатом. Повышенная фототоксичность делает эти белки лучшими генетически кодируемыми GFP-подобными фотосенсибилизаторами существующими в настоящее время.

Таким образом, на основании анализа диссертационной работы можно констатировать, что цели работы, сформулированные автором, достигнуты, а поставленные задачи выполнены. При этом Д.А. Горбачев проявил себя как высококвалифицированный специалист, владеющий широким арсеналом современных методов исследований в области молекулярной биологии, биохимии и биофизики. Полученные автором данные являются достоверными, а сделанные выводы – логичными и обоснованными.

Диссертационная работа лишена существенных недостатков, которые могли бы препятствовать ее успешной защите. Тем не менее, в отношении работы можно сделать несколько замечаний.

1. Некоторые важные моменты изложены в тексте формально или не достаточно подробно, так что остаются неочевидными существенные детали эксперимента или непонятными обоснования тех или иных экспериментальных шагов. Например, неочевидны области генов, относительно которых проводился случайный мутагенез, и отсутствует мотивировка выбора конкретных замен в случае сайт-направленного мутагенеза mKillerOrange; не описана процедура селекции, которая была использована при отборе вариантов KillerOrange с повышенной яркостью и вариантов SuperNova с увеличенной фототоксичностью; не пояснен выбор использованных клеточных линий.

Кроме того, в диссертации не представлены некоторые важные технические результаты, что затрудняет оценку достоверности полученных результатов. Так, например, нет данных о прямом подтверждении структуры генетических конструкций, не приведены характеристики полученных белковых препаратов и т.п.

При обсуждении результатов в некоторых случаях, например, в разделе, посвященном созреванию белков SuperNova2 и KillerRed2, анализ экспериментальных данных фактически сводится к изложению их интерпретации без демонстрации логической последовательности, приводящей автора к тем или иным заключениям.

Вероятно, причина в том, что многие упомянутые здесь вещи очевидны человеку, находящемуся «в теме», и тем, что большая часть приведенных в диссертации данных

опубликована в авторитетных рецензируемых научных изданиях. Однако диссертация является отдельным научным трудом, который должен быть понятен неспециалисту в частной области интересов автора.

2. Ряд подписей к рисункам в диссертационной работе следовало бы доработать. Так, в подписях к рисункам 4, 30 и 31 есть только обозначения отдельных панелей, но нет общего названия рисунка; а в подписях к рисункам 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18 не расшифрованы использованные обозначения.
3. В разделе «Материалы и методы» при описании условий центрифугирования следовало бы указать, помимо скорости вращения ротора (об/мин), еще и радиус ротора. Более корректным было бы заменить данные параметры, как обычно принято, фактором разделения – отношением центробежного ускорения к ускорению свободного падения (g).
4. Во многих местах использованы некорректные обозначения единиц измерений «мин.» вместо «мин», «сек.» и «секунда» вместо «с», «час» вместо «ч».
5. Отдельно необходимо отметить, что в обзоре литературы, на мой взгляд, не хватает обобщений. При том, что, как упоминалось выше, проведенный анализ данных, несомненно, важен как для развития работы, так и для ее понимания, представленный обзор в его настоящем виде напоминает энциклопедию, составленную из очень содержательных, но отдельных, статей, связанных общей темой. Хотелось бы видеть в обзоре более глубокий анализ проблем и перспектив разработки и применения фототоксичных флуоресцентных белков. Такой визионерский взгляд от квалифицированного специалиста в предметной области был бы, на мой взгляд, крайне полезен читателю.

Следует подчеркнуть, что высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают ценности диссертационной работы. Диссертация Д.А. Горбачева представляет собой законченное научное исследование. Актуальность полученных данных и высокий методический уровень работы не вызывают сомнений. Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в зарубежных и российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для публикации материалов диссертаций, и тезисах докладов международных конференций. Автореферат диссертационной работы полностью отражает содержание выполненной работы.

На основании вышеизложенного следует сделать заключение, что 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:

Демидюк Илья Валерьевич,

доктор химических наук, доцент, профессор РАН,
заведующий лабораторией функциональной энзимологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»
(НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ)

Контактные данные: 123182, Россия, Москва,
площадь Академика И.В. Курчатова, д. 2
Тел.: +7 (499) 196-18-53, e-mail: duk@img.ras.ru

Подпись д.х.н. И.В. Демидюка заверяю.

Заместитель директора НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ,



Филиппов Максим Владимирович

10 июня