



**МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
(МГУ)
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО**

Ленинские горы, Москва, ГСП-1, 119991

Телефон: 939-53-59, Факс: 939-31-81

12 мая 2014 № 107-14/203-03

На № _____

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Билана Дмитрия Сергеевича: «Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры окислительно-восстановительных процессов в живых системах», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология - 03.01.03.

Диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича посвящена разработке новых биосенсоров, позволяющих регистрировать некоторые окислительно-восстановительные процессы в живых системах. Это новое направление в современной науке чрезвычайно важно и перспективно. Активные формы кислорода (АФК), участвуют в самых разных внутриклеточных процессах. Еще совсем недавно АФК приписывали лишь негативную роль, поскольку они, благодаря своей высокой реакционной способности, могут вызывать окислительное повреждение разного рода молекул клетки. В дальнейшем оказалось, что в небольших концентрациях АФК играют важную роль в регуляции важнейших внутриклеточных каскадов. В частности, молекула пероксида водорода способна избирательно и обратимо модифицировать сульфгидрильные группы некоторых белков, регулируя тем самым их функции. Проблема регуляторных функций АФК очень актуальна и требует разработки новых современных методов измерений. Ранее для измерения АФК были доступны лишь синтетические красители, многие из которых обладали существенными недостатками, такими как низкая специфичность и токсичность. Реакции многих таких индикаторов необратимы, а в некоторых случаях они сами могут

служить источником АФК и других артефактов. Несмотря на это, подобные индикаторы широко используются за неимением других подходящих методов.

Важным достижением автора явилось усовершенствование генетически кодируемого флуоресцентного сенсора для регистрации пероксида водорода НuPer. Полученный вариант биосенсора, НuPer-3, окисляется и восстанавливается значительно быстрее, чем более ранние версии НuPer и это делает его незаменимым инструментом для регистрации быстрых колебаний H_2O_2 в живых системах. Проведенное тестирование НuPer-3 в культуре клеток и *in vivo* подтвердило его применимость.

В своей работе автор уделил большое внимание вопросу детекции состояния редокс пар в клетке. В частности был разработан новый генетически кодируемый флуоресцентный сенсор для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН в живых клетках. Измерения этого ключевого для клетки параметра ранее было сопряжено с большими трудностями.

Диссертация Билана Д.С. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, методической части, описания результатов исследования и их обсуждения, а также заключения и выводов, списка сокращений и списка литературы (всего 304 источника). Материал диссертации изложен на 127 страницах.

Обзор литературы включает три основных раздела. Первый раздел посвящен основным типам АФК и их источникам в живых системах. Особое внимание автор уделяет их сигнальной роли в клетках. Поскольку работа посвящена разработке новых методов, позволяющих регистрировать различные окислительно-восстановительные процессы, автор достаточно подробно описал существующие методы регистрации АФК, изложив основные преимущества и недостатки этих методов. Независимой частью данной главы является описание основных активных редокс пар клетки. Более подробно в работе рассматривается роль соотношения НАД⁺/НАДН в клетке, которая ограничивается не только энергетическим метаболизмом клетки. В работе присутствуют описания ранее существовавших методов определения данного клеточного параметра. Отдельный раздел автор целиком посвящает механизму работы транскрипционного фактора Rex, поскольку именно этот белок в дальнейшем был взят за основу при создании биосенсора для регистрации динамики изменения соотношения НАД⁺/НАДН. Заключительный раздел обзора литературы, касающийся флуоресцентных белков, предваряет методологическую часть экспериментальной работы. При этом автор не останавливается подробно на разнообразии самих флуоресцентных белков, чему посвящено большое количество обзорных работ, а приводит примеры существующих биосенсоров на основе флуоресцентных белков, в том числе и регистрирующих некоторые окислительно-

восстановительные процессы. В целом обзор литературы очень содержателен и хорошо структурирован.

Основываясь на теоретической части своей работы автор формулирует ее основную цель, которая делится на две независимые составляющие, а именно на усовершенствование ранее созданного биосенсора NuPer для регистрации пероксида водорода и создание нового биосенсора для измерения соотношения НАД⁺/НАДН.

В разделе «Материалы и методы» автор детально описывает все использованные в работе методы.

Глава «Результаты и обсуждение» поделена на два раздела. Первый раздел посвящен усовершенствованию генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора NuPer, с помощью которого можно регистрировать пероксид водорода в живых системах в режиме реального времени. При создании исходного биосенсора NuPer в структуру H₂O₂-чувствительного домена бактериального белка OxyR был введен круговой пермутант желтого флуоресцентного белка (cpYFP). Спектральные характеристики NuPer изменяются в результате конформационных перестроек сенсорной части химерного белка, вызванных специфичным и обратимым взаимодействием с H₂O₂. Сегодня NuPer используют во многих лабораториях мира для решения многих задач связанных с изучением окислительно-восстановительных процессов. Однако для многих биологических моделей динамический диапазон NuPer оказался недостаточным, особенно в условиях, когда концентрация H₂O₂ меняется незначительно. Так появилась необходимость в усовершенствовании данного инструмента. Первой из усовершенствованных версий стал NuPer-2, который отличался от исходного варианта расширенным динамическим диапазоном ответа. К сожалению, NuPer-2 утратил некоторые из своих полезных свойств, характерных для исходной конструкции. Было показано, что NuPer-2 является димером в отличие от мономерного NuPer, что значительно ухудшило его кинетические параметры.

Автору диссертационной работы пришлось протестировать целый ряд мутаций в области, отвечающей за димеризацию OxyR. В результате удалось создать новый биосенсор NuPer-3, который отличается от исходного варианта увеличенным динамическим диапазоном ответа, но при этом скорость реакций окисления и последующего восстановления нового биосенсора значительно выше по сравнению с NuPer-2. NuPer-3, как и исходный NuPer является мономером. Преимущества использования NuPer-3 были продемонстрированы *in vitro* и *in vivo*. Впервые удалось зарегистрировать градиент H₂O₂ в тканях животного на модели раны хвостового плавника *Danio rerio*. Для проведения этих измерений автором и коллегами была создана

трансгенная линия *Danio rerio*, в которой НуPer-3 экспрессировался под контролем промотора β -актина. Прделанная работа открывает широкие перспективы для дальнейших исследований.

Интересные результаты были получены при использовании микроскопии в режиме регистрации времени жизни флуоресценции FLIM. Ранее микроскопию в режиме FLIM использовали для систем с двумя флуорофорами, для сенсоров на основе FRET взаимодействий. В настоящей работе впервые было показано, что время жизни флуоресценции может значительно меняться и для биосенсоров с одним флуорофором. При окислении НуPer и НуPer-3 время жизни флуоресценции уменьшается, это позволяет регистрировать пероксид водорода в режиме регистрации времени жизни флуоресценции. Данная часть работы имеет не только методическое значение, но и указывает на перспективы изучения биофизических основ изменений параметров флуоресценции биосенсоров данного типа.

Второй раздел посвящен созданию биосенсора для регистрации соотношения NAD^+/NADH в живых клетках. Автор успешно применил схему, разработанную ранее при создании биосенсора НуPer, используя в качестве сенсора белок T-Rex из *Thermus aquaticus*. Созданный биосенсор RexYFP измеряет соотношение NAD^+/NADH даже при условиях, когда доля NADH мала, что открывает возможности его использования для регистрации соотношения NAD^+/NADH как в цитоплазме, так и в матриксе митохондрий с высоким содержанием восстановленной формы нуклеотида. По данному критерию, созданный автором биосенсор RexYFP, на сегодняшний день, не имеет аналогов. Можно надеяться, что, как и в случае с биосенсором НуPer, новый сенсор позволит получить важнейшую информацию о редокс регуляции клеточных процессов.

Биосенсор RexYFP позиционируется в работе как индикатор, позволяющий регистрировать соотношение NAD^+/NADH в живых системах. Однако *in vitro* было показано, что сигнал биосенсора изменяется при одновременном изменении NAD^+ и NADH , или при изменении NADH в присутствии избытка окисленной формы кофактора. Можно заключить, что данный биосенсор направлен на измерение NADH , а не соотношение NAD^+/NADH . И если он все же измеряет именно соотношение NAD^+/NADH , то автору следовало бы это прямо показать, сравнив, например кривую титрования NADH при разных уровнях NAD^+ в системе.

Автор использовал биосенсор RexYFP с цитоплазматической и митохондриальной локализациями для регистрации изменений соотношения NAD^+/NADH в соответствующих компартментах в различных клеточных моделях. Предполагается, что биосенсор позволит исследовать кинетику изменений этого параметра. В условиях

ингибирования дыхательной цепи митохондрий на уровне комплекса I с помощью избытка (25 мкМ) ингибитора ротенона было показано, что RexYFP регистрирует повышение НАДН в обоих клеточных компартментах в течение 15-20 минут. Однако ранее было неоднократно показано, что ротенон при всех его побочных эффектах очень быстро повышает НАДН в клетках. В своей работе автор не комментирует этот факт и, таким образом, остается открытым вопрос о применимости RexYFP для кинетических измерений.

Приведенные выше недостатки ни в коей мере не снижают общего положительного впечатления от диссертации Д.С. Билана. Разработанные им инструменты представляют большую ценность и имеют широкие перспективы для дальнейшего применения в различных областях науки. В диссертации представлен очень большой объем экспериментальной работы, выполненной на чрезвычайно высоком современном уровне. Сделанные выводы отражают результаты работы, ее новизну, и заслуживают полного доверия.

Сформулированные в работе выводы аргументированы и отражают суть полученных автором результатов. А сама работа соответствует заявленной специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича соответствует требованиям п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

**заведующий Лабораторией биоэнергетики клетки
Научно-исследовательского института
физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ
Доктор биологических наук,
Черняк Борис Викторович**

