

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу 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.

Актуальность, объект и предмет исследования

Диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича посвящена важному вопросу создания инструментария для проведения высокотехнологичных научных исследований внутриклеточных окислительно-восстановительных процессов. Автором был охарактеризован новый, улучшенный вариант сенсора к пероксиду водорода HyPer-3, и создан уникальный сенсор, позволяющий регистрировать соотношение НАД⁺/НАДН и оценивать окислительно-восстановительный статус клетки. Эти сенсоры обладают двумя важными качествами. Во-первых, они генетически кодируемы и предназначены для работы с живыми и одиночными клетками. Во-вторых, они являются ратиометрическими, что делает их пригодными для количественного анализа внутриклеточных метаболитов в режиме реального времени.

Область применения созданных биосенсоров очень широка. HyPer-3 может успешно использоваться при изучении сигнальных свойств активных форм кислорода. Прежде всего, речь идет об H₂O₂. В настоящее время H₂O₂ относят ко вторичным посредникам из-за его способности регулировать активность некоторых сигнальных молекул путем обратимой модификации их тиоловых групп. HyPer-3 существенно отличается от предыдущих версий этого сенсора широким динамическим диапазоном и быстрой динамикой окисления и восстановления. Эти характеристики служат важным преимуществом при регистрации быстрых колебаний пероксида водорода в условиях живой клетки. HyPer-3 был успешно испытан *in vitro* и его преимущества были продемонстрированы *in vivo* в модели раны хвостового плавника *Danio rerio*.

Важным достижением следует считать результаты автора по использованию микроскопии в режиме детекции времени жизни флуоресценции (FLIM). Оказалось, что при окислении сенсоров типа НуPer время жизни флуоресценции уменьшается даже в системе с одним флуорофором, а не только в системах, основанных на FRET-взаимодействиях. Автор продемонстрировал, что не только НуPer можно использовать в этом режиме, но и модификация НуPer-3 более предпочтительна.

Отсутствие адекватных методов и инструментария до недавнего времени сильно ограничивали исследования окислительно-восстановительных процессов клетки. Создание генетически кодируемых биосенсоров на основе флуоресцентных белков позволяет во многом решить эти проблемы и эта область стремительно развивается. Важнейшим достижением данной работы было создание биосенсора для регистрации внутриклеточной динамики $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ в режиме реального времени. До этого момента подобных методов не существовало. Биосенсор RexYFP создан на основе пермутанта желтого флуоресцентного белка, интегрированного в последовательность бактериального белка T-Rex из *Thermus thermophilus*. Новый биосенсор был успешно испытан *in vitro*. На сегодняшний день это единственный биосенсор, позволяющий регистрировать изменения соотношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ как в цитоплазме, так и в матриксе митохондрий клеток. Он был охарактеризован по чувствительности к рН в физиологическом диапазоне и был разработан подход, позволяющий учитывать влияние колебаний рН на общий сигнал биосенсора. Этот подход может быть использован в последующих работах с другими биосенсорами на базе рН-чувствительных флуоресцентных белков.

Таким образом, цели и конкретные задачи данной работы весьма актуальны и адекватны современным тенденциям и потребностям экспериментальной науки.

Структура и объем работы

Диссертация Билана Д.С. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, глав, посвященных описанию материалов и методов, результатов и обсуждения, а также выводов и заключения. Диссертация изложена на 127 страницах.

Обзор литературы содержит 3 основные части. Первую автор посвящает АФК: их видам и способам образования в клетке, роли и механизмам реализации их функций. Подробно рассмотрены антиоксидантные системы клетки и наиболее распространенные методы регистрации АФК; проанализированы их недостатки и преимущества. Вторая часть обзора посвящена описанию главных редокс активных пар клетки. Автор подробно описывает пару НАД⁺/НАДН, поскольку именно для нее был создан биосенсор RexYFP, и уделяет должное внимание парам НАДФ⁺/НАДФН и GSH/GSSG. В заключительной части автор анализирует структуру и свойства генетически кодируемых биосенсоров нового поколения, уделяя особое внимание флуоресцентным сенсорам окислительно-восстановительных процессов. В целом, обзор литературы содержит всю необходимую информацию и написан на высоком уровне.

В разделе «Материалы и методы» автор подробно излагает используемые в работе методы. Адекватность использованных методов и их современный уровень не вызывают сомнений. Следует особо отметить многообразие методов, которые охватывают четыре больших области: молекулярную биологию и клонирование ДНК-конструкций, биохимию и работу с изолированными белками, клеточную биологию с ведением клеточных культур и использованием современных методов микроскопии, а также элементы физиологии и использование моделей *in vivo*. Это свидетельствует о высоком квалификационном уровне работы и самого автора.

Глава «Результаты и обсуждение» делится на две независимые части. Одна из них посвящена новой модификации созданного ранее и на сегодняшний день широко известного биосенсора NuPer, а другая часть разработке абсолютно нового биосенсора RexYFP для регистрации динамики соотношения НАД⁺/НАДН в живой клетке. Эти разделы содержат необходимое количество фактуальной информации, обосновывающей правомерность сделанных автором выводов. В них подробно обсуждаются характеристики новой версии биосенсора к пероксиду водорода, NuPer-3, и нового биосенсора RexYFP в контексте сравнения с существующими индикаторами подобного типа. Это дает полную картину о всех преимуществах и недостатках новых сенсоров.

Критические замечания по результатам и оформлению работы не изменяют значимости исследования и не умаляют достоинств работы. Они вынесены ниже в отдельный раздел и носят дискуссионный характер.

Замечания по работе

Работа написана легким и живым языком, очень легко воспринимается и понимается. Вместе с тем иногда наблюдается некоторая поверхностность в использовании русского языка, невынужденное увеличение объема и языковые неточности. Этого можно было бы избежать при внимательной проверке текста, в том числе привлекая коллег. Например, автор употребляет термин "полупериод окисления/восстановления". Позволю заметить, что обычно используют термин "период полувосстановления" и эта величина может сильно отличаться. Подобная неразборчивость ведет и к более серьезным казусам. Как пример, считаю должным привести рисунок 17, где представлены формулы НАД⁺ и НАДН. Известно, что эти соединения содержат рибозу, а не показанную на рисунке дезокситетрозу. Следует отметить, что подобная ошибка широко распространена в интернете, откуда видимо и взята эта иллюстрация. Лучше использовать надежные источники, такие как классические учебники по биохимии (например, ссылка 158 в диссертации).

В разделе 3.1.2 автор ставит вопрос о том, что различие периодов полуокисления исследуемых вариантов НуPer может быть связано с их разным сродством к субстрату (пероксиду) или скоростью развития сенсорной реакции. Для ответа на этот вопрос не был использован стандартный кинетический анализ *in vitro*, так как не удалось получить чистый белок. Вместо этого автор применил прижизненную микроскопию клеток в условиях эффективной замены среды. К сожалению, эти эксперименты не проиллюстрированы, а приведены лишь их конечные результаты в виде рассчитанных значений. Мне осталось не ясным, как же образом автор смог разделить эти два параметра и индивидуально определить константы скоростей реакций НуPer с пероксидом? Имеют ли эти сенсоры разное сродство к субстрату? Следует также отметить, что в расчетах автор использовал полученные в предыдущих работах значения концентраций H₂O₂, вызывающие пороговые изменения флуоресценции НуPer. Они составляют 25 нМ пероксида для очищенного препарата НуPer и 5 мкМ экзогенного H₂O₂ для НуPer, который был

экспрессируется в бактериях, но не *эндогенного* H₂O₂ в цитоплазме как ошибочно указывает автор. По-видимому, это опечатка, но она также не проясняет того как автор *определил* "наличие приблизительно 200-500-кратного градиента H₂O₂ через цитоплазматическую мембрану". Является ли эта величина экспериментальной или расчетной?

Дальнейшие вопросы касаются сенсора НАД⁺/НАДН. Исходно, REX – это транскрипционный фактор, действие которого обусловлено связыванием с ДНК. В связи с этим, проверял ли автор возможность такого взаимодействия для RexYFP, и влияет ли оно на флуоресцентные свойства и/или локализацию сенсора в клетке? Кроме того, Rex формирует гомодимеры. Влияет ли это свойство на активность сенсора и накладывает ли оно ограничения на его использование?

Аналогичный вопрос возникает относительно флуорофорной части сенсора НАД/НАДН: как димеризация белковой части RexYFP сказывается на его флуоресцентных свойствах и ограничивает ли это применение сенсора в клетках? Как связаны эта димеризация и димеризация самого Rex-домена, влияют ли эти процессы друг на друга и изменяют ли они свойства сенсора?

Следует признать, что последние вопросы не обязаны найти отражение в данной работе, которая безусловно является первой в серии новых исследований. С очевидностью, данная работа выступает хорошим заделом для последующих исследований, которые прояснят многие аспекты функционирования биосенсоров и позволят создать их новые и улучшенные версии. Научный и квалификационный уровень, также как и ее значимость данной работы для научного сообщества, не вызывают никаких сомнений.

Заключение

Диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича является законченным научным исследованием, содержащим новое решение актуальной научной задачи. Результаты этой работы имеют большое значение для биологических и медицинских исследований. Полученные автором сенсоры успешно применяются в других лабораториях, в том числе и за рубежом. Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. Автореферат достаточно полно и корректно передает содержание диссертационной работы и оформлен надлежащим

образом. Высказанные замечания не принципиальны и имеют дискуссионный характер. Диссертация соответствует требованиям п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор Билан Дмитрий Сергеевич заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – "Молекулярная биология".

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной эндокринологии
Института экспериментальной кардиологии
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Российский кардиологический
научно-производственный комплекс» МЗ РФ,

А.В. Воротников

12 мая 2014 года

Подпись ведущего научного сотрудника, кандидата биологических наук,
А.В. Воротникова, заверяю,
Ученый секретарь Института Экспериментальной Кардиологии Российского
кардиологического Научно-производственного комплекса МЗ РФ



Левашова С.А.