

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Костюка Александра Игоревича** “Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

За последние десятилетия накоплен значительный объем данных показывающих, что многие заболевания сопровождаются острым или же хроническим воспалением. К ним относятся такие патологии как злокачественные новообразования, коронарные синдромы, атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, аутоиммунные болезни и многие другие. Одной из характерных черт воспалительных реакций является непосредственное участие иммунных клеток, в частности, нейтрофилов, которые выделяют в окружающие их ткани целый спектр биологически активных соединений, в частности нейтрофилы содержат значительные концентрации фермента миелопероксидазы (МПО), способного синтезировать гипогалогенные кислоты путем окисления галогенид-анионов пероксидом водорода. В норме данные высоко реакционноспособные молекулы, к которым относятся HOCl , HOBr и HOscN , используются организмом для разрушения клеток патогенных микроорганизмов. Однако, в тех случаях, когда иммунная система выходит из-под контроля, те же самые агенты могут приводить к повреждению собственных тканей животного. В частности, показано, что активность МПО является одним прогностических маркеров тяжести протекания атеросклеротических процессов. Именно поэтому этот фермент рассматривают как одну из перспективных мишеней в рамках терапии заболеваний с воспалительной компонентой.

К сожалению, на текущий момент исследование редокс-метаболизма гипогалогенных кислот существенно осложнено тем фактом, что традиционные аналитические методики по их детекции не могут быть использованы в условиях *in vivo*, либо же характеризуются низкой чувствительностью, а также сопряжены со значительными трудностями при введении репортеров в ткани экспериментальных животных. Возможное решение описанной проблемы лежит в сфере разработки генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. Такого типа сенсоры имеют высокую селективность и чувствительность, а также могут быть проэкспрессированы в широком круге модельных организмов до начала эксперимента, что минимизирует стрессовое воздействие на организмы. Таким образом, создание генетически кодируемого сенсора для прижизненной визуализации гипогалогенных кислот в режиме реального времени является актуальной задачей, как с точки зрения фундаментальной биологии, так и ее прикладных направлений.

Диссертационной работы Костюк А. И. имеет пионерский характер, поскольку в ней разработан первый в мире генетически кодируемый флуоресцентный сенсор для визуализации гипогалогенных кислот на основе циркулярно пермутированного желтого флуоресцентного белка и бактериального транскрипционного фактора *NemR*. Полученный сенсор, который был назван *Nurocrates*, обладает высокой чувствительностью, хорошей селективностью, демонстрирует быстрый и в ряде случаев обратимый ответ, а также может быть использован в живых системах различного уровня сложности. Помимо детального описания биохимических свойств сенсора, автор с коллегами продемонстрировали его использование для визуализации гипогалогенного стресса, с которым сталкиваются бактерии в ходе фагоцитоза нейтрофилами, а также редокс-процессов, протекающих в области раны у мальков *Danio rerio*. Тем самым, им удалось впервые зарегистрировать продукцию гипогалогенных кислот в режиме реального времени в указанной модели, что

служит подтверждением известной гипотезы о том, что градиент пероксида водорода, распространяющийся от зоны ампутации, конвертируется в активные формы галогенов. Не возникает сомнений, что Нурocrates окажется востребованным инструментом и займет свое место в арсенале лабораторий, изучающих воспалительные реакции и взаимодействие клеток иммунной системы с патогенами. Нурocrates также является первым редокс-сенсором на основе циркулярно пермутированного флуоресцентного белка, для которого была установлена пространственная структура.

Диссертационная работа Костюка А. И. построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Списка литературы. Работа изложена на 230 страницах, содержит 46 иллюстраций и 5 таблиц. В работе используется удивительно большое число источников- 695, среди которых представлены как классические работы по теме, так и свежие публикации 2022 года.

Во Введении автор детально описывает актуальность исследования, подробно обсуждает его новизну, а также теоретическую и практическую значимость полученных результатов. Данный раздел содержит перечисление задач, выделенных в рамках работы, которые полностью соответствуют поставленной цели. Автор также кратко характеризует основные методы исследования и статистические аспекты обработки данных, что позволяет сформировать впечатление о степени достоверности результатов.

Обзор литературы состоит из трех основных смысловых блоков. Наиболее интересным и удачным является первый раздел посвящен гипогалогенным кислотам и аналитическим методам их детекции в живых системах. Раздел начинается с описания ферментативных систем, приводящих к генерации HOCl , HOBr и HOscN в живых клетках. Далее автор обсуждает взаимодействие данных окислителей с основными органическими мишенями в клетках, при этом в центре рассмотрения оказываются кинетические параметры соответствующих реакций. Достаточно внимания уделено сравнительной биохимии различных (псевдо)гипогалогенных кислот. Все это позволяет сформировать механистическое представление о том, как именно данные агенты модифицируют компоненты живых систем. С одной стороны, он подчеркивает тот факт, что согласно имеющимся данным обсуждаемые агенты оказывают достаточно селективные эффекты, однако, в то же самое время, в общих чертах обрисовывает большие пробелы, существующие в этом вопросе, а также обсуждает противоречащие друг другу наблюдения. С точки зрения оппонента было бы интересно провести классификацию по реакционноспособным группам, определяющим функцию определенных белков и ферментов и обсудить возможные механизмы. Например, широко известна группа цистеиновых протеиназ – каспаз, которые, казалось бы, должны быть одной из первичных мишеней инактивации. Однако в клетке эти ферменты находятся в неактивной форме прокаспаз и в ряде случаев наоборот, происходит их активация. Автор также детально описывает современные аналитические техники по регистрации гипогалогенных кислот в живых системах (включая хромогенные и флуорогенные красители, детекцию маркеров при помощи масс-спектрометрии, а также подходы, основанные на ЯМР и позитронно-эмиссионной томографии). Во всех случаях, представлены не только общие принципы методов, но и обозначены их преимущества, недостатки, а также очерчены границы применимости. Данная информация подводит читателя к актуальности разработки генетически кодируемого сенсора для регистрации гипогалогенных кислот.

Второй блок Обзора литературы посвящен флуоресцентным белкам, которые используются в качестве репортерных модулей генетически кодируемых индикаторов. Он включает в свой состав общеизвестную информацию о пространственной структуре и

созревании данных молекул, а также описание их оптических свойств. Далее автор в общих чертах перечисляет современную палитру флуоресцентных белков, как обнаруженных в природе, так и созданных при помощи инструментария белковой инженерии.

В рамках третьего блока Обзора литературы автор предлагает свою классификацию генетически кодируемых сенсоров. Особого интереса представляет исторический обзор, посвященный возникновению и совершенствованию технологии сенсоров, основанных на циркулярно пермутированных флуоресцентных белках. В целом, представленная информация обобщает основные идеи, лежащие в основе конструирования редокс-индикаторов, но при этом совершенно не обсуждаются особенности радиометрических сенсоров основанных на конформационных равновесиях различных состояний протонирования хромофора. Обзор литературы завершается кратким описанием ранее предпринятых попыток исследовать гипогалогенный стресс при помощи флуоресцентных белков, при этом автор критически осмысливает результаты, полученные в рамках таких работ.

Раздел «Материалы и методы» написан грамотным и четким языком, содержит достаточно детальное описание всех экспериментальных процедур, которое позволит заинтересованному читателю воспроизвести любые из них. Следует отметить, что в рамках диссертационного исследования был использован широкий арсенал современных методик: молекулярное клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантных белков, флуориметрия белковых препаратов, аналитическая гель-фильтрация, выделение первичных нейтрофилов из крови человека, флуоресцентная микроскопия клеточных культур. Совместно с коллегами были измерены кинетические свойства разработанного сенсора, а также установлена его пространственная структура методом рентгеноструктурного анализа; проведена гетерологичная экспрессия сенсора в тканях модельного объекта *Danio rerio*, и осуществлено моделирование воспаления путем ампутации хвостового плавника мальков. Статистическая обработка данных и анализ изображений проводили современными программными пакетами. Но при этом есть и некоторые неточности в описании. Например, автор не говорит прямо о том, что для наработки белков в прокариотах он использовал шести гистидиновый таг. Об этом можно только догадаться по типу аффинной хроматографии. При определении оптических свойств не указано, каким образом определялась степень чистоты белков и полнота созревания флуоресцентных белков. При описании спектральных и микроскопных экспериментов используется лабораторный сленг, например «дихроматическое зеркало» вместо дихроического, «барьерный фильтр» вместо узкополосного или широкополосного фильтра, отсекающие фильтры и детекторы вообще не указаны. Вместо облучения светом используется термин «обработка светом».

Раздел «Результаты и обсуждение» начинается с обобщения информации об известных белках, демонстрирующих селективность в отношении HOCl , хотя логичнее перенести этот раздел в литературный обзор. На основании проведенного анализа автор делает вывод о том, что *NemR* из *E. coli* является наиболее оптимальной платформой для разработки генетически кодируемого сенсора. Для того, чтобы конвертировать конформационные изменения, происходящие в подвижной петле *NemR*, в оптический сигнал, автор создал 12 молекулярно-генетических конструкций путем интеграции циркулярно пермутированного YFP (cpYFP) в обсуждаемый регион. Полученные химеры были проэкспрессированы в бактериях, после чего очищенные препараты белков исследовали на предмет яркости и чувствительности к NaOCl . Версия, продемонстрировавшая максимальную амплитуду ответа (~1.6 раза), была названа *Nurocrates* и отобрана для дальнейшей работы. Сигнал *Nurocrates* является радиометрическим, при этом наблюдаемые сдвиги связаны как с изменением квантовых

выходов флуоресценции, так и молярных коэффициентов поглощения протонированной и депротонированной форм хромофора.

Показано, что *Nurocrates* чувствителен ко всем гипогалогенным кислотам (HOCl, HOBr, HO SCN), а также к некоторым их производным (N-хлоротаурин). В определенном концентрационном диапазоне ответ сенсора является обратимым и может быть нивелирован путем инкубации белка с восстанавливающим агентом. Автор также продемонстрировал, что высокие дозы более агрессивных окислителей (HOCl и HOBr) приводят к частичной инактивации сенсора. Насыщение индикатора происходит при молярном соотношении аналит/белок около 10/1, а пределы детекции в использованной системе лежат в области 0.2-0.6/1. Ответ *Nurocrates* является достаточно селективным – очищенный белок не изменяет оптические свойства в присутствии широкой палитры редокс-соединений. Единственным исключением оказывается пероксинитрит. Автор также показал, что сигнал сенсора зависит от кислотности среды в физиологическом диапазоне, из чего следует, что использование *Nurocrates* должно сопровождаться адекватными pH-контролями. При этом сенсор сохраняет чувствительность к аналитам в диапазоне pH от 6.7 до 8.2, хотя в лизосомах pH может опускаться до 4-5. Температура окружающей среды представляет собой другой фактор, оказывающий влияние на оптические свойства инструмента. Так, нагревание среды приводит к сдвигам соотношения конформеров с протонированной и непротонированной формой хромофора, что несколько снижает максимальную амплитуду ответа. Соответственно, использование *Nurocrates* в теплокровных организмах может сталкиваться с рядом сложностей, поскольку области воспалений температура может быть повышенной.

Поскольку в клетке существует значительное количество потенциальных мишеней гипогалогенных кислот, эффективный сенсор должен быть способен конкурировать с ними за целевые аналиты. Совместно с иностранными коллегами автор проанализировал кинетические параметры *Nurocrates* и установил, что исследуемый белок обладает необычно высокой реакционной способностью в отношении N-хлоротаурина. Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что основными мишенями *Nurocrates* в живых системах будут являться галамины, вторичные продукты гипогалогенных кислот.

Для того, чтобы установить механизм функционирования сенсора, автор заменял ключевые аминокислотные остатки *NemR* (Cys106 и Lys175) на реакционно инертные группы. Оказалось, что наличие лишь Cys106 является необходимым для того, чтобы *Nurocrates* демонстрировал оптические сдвиги в ответ на N-хлоротаурин. При этом в условиях *in vitro* HOCl и HOBr, но не HO SCN, способны вызывать неспецифическое окисление сенсора. Подобный эффект не воспроизводится в цитоплазме живых клеток, поскольку гипогалогенные кислоты не успевают прореагировать с сенсором напрямую и конвертируются во вторичные производные. Таким образом, *NurocratesCS* может выступать в качестве контрольной версии для детекции артефактов, связанных с изменением показателя pH. Автор также показал, что другие белки на основе *srYFP* не демонстрируют выраженные оптические сдвиги в присутствии гипогалогенных кислот, что с высокой вероятностью исключает прямое участие репортерного домена в узнавании аналитов.

На примере клеточной культуры HeLa Kyoto продемонстрировано, что *Nurocrates* функционально активен в эукариотических системах экспрессии. На следующем этапе работы сенсор был использован для визуализации развития гипогалогенного стресса в цитоплазме живых бактерий, фагоцитируемых первичными нейтрофилами человека. Ответ *Nurocrates* достигал насыщения примерно на второй минуте после интернализации

микроорганизма в полость фагосомы. Данный эксперимент представляет собой первое описание динамики (псевдо)гипогалогенных кислот в цитоплазме бактерий, зарегистрированное при помощи достаточно селективного инструмента. В дальнейшем разработанная модель может стать перспективной платформой для исследования взаимодействия патогенов и клеток иммунной системы, а также для изучения различных химических модуляторов этого процесса. Наконец, совместно с иностранными коллегами, автор впервые в литературе визуализировал продукцию гипогалогенных кислот в области раны, вызванной ампутацией хвостового плавника *Danio rerio*. До сих пор были опубликованы лишь косвенные свидетельства того, что пероксид водорода, продуцируемый тканью в ответ на механическое повреждение и служащий для привлечения лейкоцитов, конвертируется в HOCl и/или аналогичные молекулы. Таким образом, настоящее исследование экспериментально подтвердило тот факт, что регион ампутации действительно является очагом (псевдо)гипогалогенного стресса.

В сотрудничестве с иностранными коллегами были получены кристаллы белка НурocratesCS и расшифрована его пространственная структура методом рентгеноструктурного анализа. Показано, что хромофор *srYFP*-домена находится в тесном контакте с остатком Asn95, который расположен в начале подвижной петли *NemR*, изменяющей свою конформацию при NaOCl-опосредованном окислении. Посредством водородных связей Asn95 взаимодействует с аминокислотами данного региона (Gln96, Phe97 и Gln99), что может лежать в основе передачи сигнала от сенсорного к репортерному домену инструмента. Интересно, что боковая цепь Gln99 также образует водородную связь с остовом остатка Gly354, соседствующим с ключевым цистеином (Cys355, положение соответствует Cys106, в данном случае нумерация по полной последовательности сенсора в котором *nemR* расположен на С-конце флуоресцентного белка). В целом, НурocratesCS представляет собой первый редокс-сенсор на основе циркулярно пермутированного флуоресцентного белка, для которого известна пространственная структура. Данная информация может быть использована для последующей рациональной оптимизации не только будущих версий Нурocrates, но и других сенсоров со схожим строением (например, сенсоров семейства НурPer).

В разделе «Заключение» автор кратко обобщает основные результаты исследования, а также подчеркивает их теоретическую и практическую значимость. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Материалы диссертационной работы Костюка А. И. опубликованы в 6 статьях в международных рецензируемых журналах и представлены в 3 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

По оформлению работы, кроме уже сделанных, можно добавить следующие замечания.

- 1) При обсуждении бимолекулярных кинетических констант имело бы смысл оценить различия в коэффициентах диффузии и ориентационный фактор, что возможно прояснило бы некоторые различия.
- 2) При указании значения кинетических констант в литературном обзоре и в целом в тексте автор почему-то использует математический знак «приблизительно» (~), в то время как при описании полученных данных используются нормальные доверительные интервалы. В чем смысл?
- 3) В некоторых местах (например, на странице 53) используется термин «краска», вместо краситель.

- 4) На рисунках 32 В и Г (рисунок 3Б в автореферате) неправильно подписана ось абсцисс (написано «длина волны» вместо мольного соотношения)
- 5) В тексте и диссертации и автореферата необходимо указать (не догадываться), что положение Cys355 соответствует Cys106, в данном случае нумерация по полной последовательности сенсора в котором pemR расположен на С-конце флуоресцентного белка

Сделанные замечания не умаляют общую положительную оценку пионерской работы Костюка А.И.

По всем критериям работа Костюка А. И. “Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров” 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 ее автор несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология – 1.5.3.

Официальный оппонент
Заведующий
Лабораторией физической биохимии
Института биохимии им. А.Н. Баха
Федерального исследовательского центра
“Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук
профессор, д.х.н.

Савицкий Александр Павлович

27 января 2023

119071, Москва,
Ленинский проспект 33, корпус 2
Тел. +7(495)9548725. E-mail: apsavitsky@inbi.ras.ru

Подпись д.х.н. Савицкого А.П.
«Удостоверяю»
Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН
к.б.н.



Орловский Александр Федорович