

# РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт белка Российской академии наук  
(ИБ РАН)

ул. Институтская, д. 4, г. Пущино, Московская обл., 142290  
Тел./факс +7(495)514-02-18; факс +7(4967)318-435 E-mail: protres@vega.protres.ru  
ОКПО 02699748, ОГРН 1025007773262, ИНН/КПП 5039001220/503901001

20.08.2017 № 115/29-01

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

“УТВЕРЖДАЮ”

Заместитель директора Института белка РАН

И.Х.Н. А.Д. Никулин



августа 2017 г.

М.П.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу ЗЛОБОВСКОЙ Ольги Анатольевны  
“Методы светозависимой активации и детекции клеточной гибели с помощью  
флуоресцентных белков”,  
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Развитие исследовательских технологий, основанных на использовании флуоресцирующих белков, началось довольно давно, в 90-х годах прошлого века. Но ещё ранее многим биологам было понятно, что такие технологии сулят революционные изменения в исследовательской стратегии и, как следствие, революционные же результаты. Эти прогнозы вполне оправдались, поэтому не удивительно, что сегодня мы наблюдаем едва ли не экспоненциальный рост числа научных работ, использующих этот инструментарий для решения совершенно разных молекулярно-биологических задач. Так или иначе, очевиден качественный скачок в разработке и использовании методов, применяющих флуоресцентные белки – теперь это не только внутриклеточная

локализация и изучение динамики белковых мишеней с помощью их мечения слиянием с флуоресцентными маркерами и использования флуоресцентной микроскопии, но и многие другие экспериментальные подходы. Например, перспективным оказалось слежение за внутриклеточными условиями с помощью разнообразных искусственных флуоресцентных белков-сенсоров, чья эмиссия зависит от ситуации внутри клетки (например, концентрации интересующего иона или pH). Ещё более впечатляет использование не инертных, но фототоксичных флуоресцентных белков – агентов, чья токсичность включается при определённом освещении и исчезает в темноте. При этом, конструируя белок, можно навязать ему будущую внутриклеточную локализацию (цитозоль, митохондрия, эндоплазматический ретикулум, ядро и т.п.). Рассматриваемая диссертационная работа О.А. Злобовской служит ярким примером исследования, использующего возможности флуоресцентных белков как для направленного воздействия на избранные клетки фототоксичными белками, так и для определения пути клеточной гибели, этим воздействием вызванной (флуоресцентный сенсор активности каспазы-3). Работа Злобовской без преувеличения находится в авангарде разработок исследовательских технологий на основе флуоресцентных белков, и это, безусловно, даёт основание признать эту работу актуальной. Кроме того, результаты, полученные О.А. Злобовской с коллегами, могут оказаться чрезвычайно полезными для развития метода фотодинамической терапии онкологических заболеваний. Очевидно, что этот аспект работы диссертанта чрезвычайно важен и, со своей стороны, добавляет полученным результатам актуальности.

Диссертация О.А. Злобовской чётко разделена на две части, посвященные совершенно разным, но логически тесно связанным задачам: в первой разработан метод активации клеточной гибели в культурах клеток млекопитающих с помощью генетически кодируемых (т.е. синтезируемых внутри самих клеток, получивших соответствующие гены) фотосенсибилизаторов из семейства GFP-подобных белков: KillerRed, KillerOrange, SuperNova и SuperNova-2. Безусловно оригинальным результатом в этой части работы служит сравнение фототоксического эффекта новых белков семейства KillerRed и обнаружение весьма перспективных свойств и характеристик белка SuperNova-2.

Вторая часть диссертации посвящена обнаружению (идентификации) апоптоза как способа клеточной гибели с помощью сенсоров на активность каспазы-3. Автором диссертации получено три варианта дальнекрасных сенсоров, работа которых базируется на FRET – безызлучательном переносе энергии, а в качестве акцептора переносимого избытка энергии впервые использован ближнеинфракрасный бактериофитохромный



белок iRFP. Фактически О.А. Злобовской и соавторами действительно впервые был создан сенсор активности каспазы-3, работающий в дальнекрасной-ближнеинфракрасной области спектра (благодаря входящему в состав сенсора белку iRFP). Говоря о несомненной связи обеих частей диссертации, должен отметить, что начало работы посвящено созданию оружия для умерщвления клеток с помощью белков – генераторов активных форм кислорода, а её завершение – конструированию инструмента для определения, каким путём клетки погибали (апоптоз или некроз). Этот инструмент пригоден, разумеется, и для детекции апоптоза в случаях других способов активации клеточной гибели.

Необходимо также обратить внимание на то, что применение созданных сенсоров апоптоза было проверено в настоящей диссертационной работе, и результаты этой проверки выявили неожиданные эффекты. Наличие результатов, отличающихся от ожидаемых авторами – верный признак настоящей научной работы, чреватой открытиями (то, что всеми ожидается и следует из логики, открытием быть не может по определению). Обнаружение Злобовской с соавторами асинхронности в процессе миграции проапоптотического белка Вах в митохондрии и начала работы каспазы-3 указывает на возможность прямой активации каспазы-9 стауроспорином. Кроме этого, закисление цитоплазмы при использовании разных агентов, вызывающих клеточную гибель, не коррелирует по времени с активации каспазы-3. Эти неожиданные находки автора диссертации предполагают возможно неточное или ошибочное представление современными исследователями о событийном ряде в процессе апоптотической гибели клетки: вполне вероятно, что применение созданного Злобовской и соавторами сенсора каспазной активности может в дальнейшем привести к смене парадигмы в этом чрезвычайно важном разделе молекулярной биологии.

Переходя к анализу текста диссертации Злобовской можно утверждать, что построен он в соответствии с традициями: начинается с раздела «Введение», предваряющего главу «Обзор литературы», включает в себя главы «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список сокращений» и заканчивается разделом «Список цитируемой литературы», содержащим 198 ссылок. В небольшом «Приложении» приведены все последовательности кодирующих частей генов полученных в работе белков. Имеется также раздел «Заключение», следующий после «Выводов», что несколько необычно. Работа обильно и качественно иллюстрирована: она содержит 50 рисунков, 31 из которых относится к обзору литературы, а 19 – иллюстрируют полученные результаты.

Всяческих похвал достойны главы «Введение» и «Обзор литературы». Первая из упомянутых полностью отвечает названию диссертации, в ней даны чёткие определения и ясно сформулирована постановка проблемы, а также приведены необходимые сведения для вхождения в круг рассматриваемых вопросов. Обзор литературы написан кратко, ясно и глубоко. Он включает в себя два раздела, каждый из которых посвящён соответствующей задаче диссертационной работы. К большим достоинствам обзора следует отнести его чёткую структуру, основанную на строгой логике описываемой работы. Очень точным, легко воспринимаемым и лаконичным языком обзор литературы сообщает читателю всё необходимое для анализа полученных результатов – от путей возникновения и способа действия активных форм кислорода до механизмов клеточной гибели и фотодинамической терапии. Разделы обзора, посвящённые близким по направленности работам (фотосенсибилизирующие белки, сенсоры апоптоза и т.п.), характеризуются не только простотой изложения, но и широким, полным охватом литературы с особым вниманием к недавним публикациям. Читать «Обзор литературы» диссертации О.А. Злобовской было приятно и интересно, как, впрочем, и весь текст диссертации. Но обзор – особенно.

Раздел «Материалы и методы» написан кратко, но тщательно, с упоминанием всех необходимых деталей экспериментов и методик. Примененные автором диссертации методы всегда полностью соответствовали решаемой задаче и приводили к её эффективному решению. Кроме того, как следует из приведенного иллюстративного материала, техническое качество результатов диссертации О.А. Злобовской довольно высокое, что говорит об экспериментальном мастерстве автора.

Изложение результатов исследования О.А. Злобовской читается с большим интересом и воспринимается легко. По моему мнению, эту диссертацию безусловно украшают результаты проверки сенсора активности каспазы-3 (см. выше). Эти результаты очень чётко намечают перспективы дальнейших работ и указывают на значение будущих исследований как для фундаментальной науки, так и для медицинских приложений. Бесспорно оригинальными следует признать и результаты изучения фототоксических свойств белков из семейства KillerRed.

Замеченные мною недостатки диссертации Злобовской вряд ли достойны упоминания – они малозначительны и легко поправимы с помощью редакторской правки. Так, в русском отсутствует глагол «мониторить» (см. с. 74), и его употребления следовало бы избегать. Также глагол «разводить» (с. 65 и 87) не полностью синонимичен глаголу «разбавлять» (особенно в современном русском), и автору следовало бы использовать



именно второй вариант этого слова. Также в тексте Злобовской нашлась и терминологическая вольность: «клеточные тельца» (с. 86) использованы вместо «телец включения» (inclusion bodies). Вообще же в тексте совсем немного опечаток и нет грамматических ошибок, хотя стилистические изредка встречаются. Чуть более существенным недостатком представляется запаздывание с расшифровкой аббревиатур: появившаяся на пятой странице аббревиатура CALI расшифровывается только на 28-ой странице. Разумеется, эти небольшие огрехи не мешают восприятию текста и совершенно не снижают качества полученных результатов.

Несколько разочаровывает неупоминание в выводах диссертации обнаруженного отсутствия корреляции по времени между активацией каспазы и миграцией белка Вах в митохондрии, а также закислением цитоплазмы. Это немного обедняет выводы. Вероятно, осторожность и требовательность автора диссертации к всесторонним контролям помешали включить обнаруженное явление в выводы работы.

Подводя итог анализу диссертации Злобовской следует признать, что к защите представлено хорошо продуманное, удачно спланированное, отлично выполненное и хорошо изложенное исследование. Надежность и научная новизна экспериментальных данных О.А. Злобовской не вызывают сомнений; выводы хорошо сформулированы, обоснованы и корректно отражают полученные результаты. Основные положения диссертационной работы опубликованы, автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Результаты диссертации могут быть использованы в исследованиях, проводимых на биологических и химических факультетах университетов, а также в следующих академических институтах: Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Институте молекулярной генетики, Институте биологии гена, Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Институте цитологии, Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова и других профильных институтах России и мира. Методические подходы и материалы диссертации могут быть использованы при обучении курсам молекулярной биологии и генетики аспирантов и студентов, обучающихся в магистратуре или заканчивающих бакалавриат.

Актуальность и новизна полученных данных, передовой методический уровень исследования и творческий вклад автора позволяют прийти к заключению о том, что диссертационная работа Злобовской Ольги Анатольевны соответствует критериям, 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 сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории механизмов биосинтеза белка Института белка РАН.

**В.А. Колб**

д.б.н., директор Института белка РАН



Собственноручная подпись  
тов. Колба В.А.  
удостоверяется  
Подпись