

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Злобовской Ольги Анатольевны на тему «Методы светозависимой активации и детекции клеточной гибели с помощью флуоресцентных белков», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

За последние несколько лет генетически-кодируемые фотосенсибилизаторы стали очень важным и удобным инструментом для исследования различных аспектов молекулярной биологии клетки. Работы, сделанные с использованием генетически-кодируемых фотосенсибилизаторов, демонстрируют разнообразие возможностей их применения. Более того, не оспаривается и важность таких фототоксичных флуоресцентных белков для клинической практики – в частности, для фотодинамической терапии опухолей. До сих пор, наиболее востребованным и изученным является первый генетически-кодируемый фотосенсибилизатор KillerRed. Необходимо, однако, отметить, что у этого флуоресцентного белка есть ряд недостатков. Очевидно, что для развития этой области молекулярной биологии важно создание и характеристика новых генетически-кодируемых фотосенсибилизаторов, а также инструментов для прижизненного исследования клеточных процессов. В связи с этим очевидна актуальность работы О.А. Злобовской, посвященной сравнительной характеристике нескольких новых фотосенсибилизаторов-производных KillerRed, а также созданию генетически-кодируемого ратиометрического сенсора на активность каспазы-3. В данной диссертационной работе проведено сравнительное исследование цитотоксической активности направленных в митохондрии белков KillerRed и его недавно полученных производных: KillerOrange, SuperNova и SuperNova-2. Кроме того, автором были созданы ратиометрические FRET-сенсоры активности каспазы-3, в которых в качестве акцептора для FRET был впервые использован ближнеинфракрасный белок iRFP.

Диссертационная работа объемом 124 страницы включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список сокращений», «Список использованной литературы» и «Приложение». В диссертации процитировано 198 научных работ; содержится 50 рисунков.

Обзор литературы состоит из двух основных частей, первая из которых посвящена фотосенсибилизаторам, механизмам образования различных АФК при их участии и

механизмам индуцируемой ими клеточной гибели. В этом же разделе дается исчерпывающий обзор реализованных экспериментально вариантов применения белка KillerRed и его производных. В этом разделе, на мой взгляд, не хватает упоминания вариантов использования другого распространенного фотосенсибилизатора, флавопротеина MiniSOG. Тем не менее, предоставленной информации оказывается более чем достаточно для понимания контекста и необходимости решения задач данной диссертации, касающихся характеристики фотосенсибилизаторов из семейства KillerRed. Вторая часть обзора литературы посвящена механизмам апоптоза и молекулярным инструментам для его детекции. Так же, как и первая, эта часть обзора литературы логично подводит читателя к постановке экспериментальной задачи по созданию нового биосенсора активности каспазы-3. В целом, обзор литературы написан очень логично, хорошо иллюстрирован и содержит необходимые сведения для понимания представленных в работе экспериментальных данных.

Раздел «Материалы и методы» написан достаточно подробно. Ознакомление с этим разделом позволяет воспроизвести использованные автором методы без привлечения специальной литературы. Несомненно, автор является высококвалифицированным исследователем, владеющим большим арсеналом молекулярно-биологических и микроскопических методов. Стоит, однако, отметить, что в разделе 2.2.3.7 не вполне понятно, через какое время после светозависимой индукции фотосенсибилизаторов проводили цитофлуориметрический анализ цитотоксичности. Автор пишет: «На следующий день среду заменяли на свежую, а через 24 часа анализировали результат облучения...». Не ясно, прошло ли после облучения 24 ч или больше.

Экспериментальные результаты работы изложены в виде двух обособленных глав в разделе «Результаты и обсуждение», посвященных фототоксичности белков семейства KillerRed и созданию FRET-сенсора активности каспазы-3, соответственно. К наиболее важным результатам этой работы стоит отнести демонстрацию цитотоксического действия производных KillerRed, KillerOrange и SuperNova-2, а также создание дальнекрасного ратиометрического сенсора на активность каспазы-3. Кроме того, стоит отметить и то, что автором впервые продемонстрирована возможность использования белка iRFP в качестве акцептора для FRET. Все полученные данные являются интересными и оригинальными. В целом раздел «Результаты и обсуждение» написан логично, результаты адекватно

обсуждаются. Тем не менее, у меня есть замечания по постановке некоторых экспериментов и оформлению результатов.

Для анализа цитотоксического действия KillerOrange автор использует цитофлуориметрический анализ клеток, подвергнутых действию активирующего света и проинкубированных затем в течение более 24 часов. В качестве внутреннего контроля использовали клетки, экспрессирующие EGFP. В таком случае, есть определенная вероятность, что разница (особенно небольшая) в количестве клеток, экспрессирующих фотосенсибилизаторы и нетоксичные флуоресцентные белки, будет обусловлена не светозависимой гибелью клеток, а тем, что повреждения, вносимые фотосенсибилизаторами, приводят к транзientной остановке клеточного цикла.

В разделе 3.2.3.1 автор пишет о том, что FRET-сенсоры, созданные в этой работе, иногда склонны к формированию «ярких фокусов». Автором отмечается, что такие фокусы появляются в клетках при их обработке стауроспорином, смене среды на раствор, обеднённый питательными веществами, изменении pH среды. Такие воздействия могут вызывать в клетке запуск аутофагии. Можно предположить, что эти фокусы представляют собой аутофагосомы, сформировавшиеся в результате запуска агрефагии (aggrephagy) – типа макроаутофагии, направленного на элиминацию белковых агрегатов. Хотя по микрофотографиям на рисунке 43 можно предположить, что в клетках с фокусами сенсора запущена программа апоптоза (возможно, каспаза-независимого).

Хочу также отметить не всегда продуманное оформление и крайне лаконичные подписи к рисункам. Так, например, подписи к рисункам 35 и 38 не дают никакого представления о том, какие экспериментальные точки анализировались, что обозначают подписи осей диаграмм (рис. 35). Подписи к рисункам, на которых представлены микрофотографии клеток (например, 37, 42, 43, 46), не содержат информации об условиях возбуждения флуоресценции, что может быть важно, например, в случае данных, представленных на рисунках 42-43. Не всегда удачен и выбор микрофотографий. Например, на рисунке 45 представлен анализ локализации белка Вах - автором отмечены временные точки начала транслокации этого белка из цитоплазмы в митохондрии, однако, по представленным микрофотографиям не очевидно, когда эта транслокация действительно начинается (и происходит ли вообще).

Сделанные замечания не являются принципиальными и не влияют на общее восприятие работы. Автореферат достаточно полно отражает существо работы. По теме диссертации автором опубликовано 5 научных статей, в двух из которых О.А. Злобовская занимает первое место в списке авторов.

Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы, ее теоретическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Злобовской Ольги Анатольевны на тему «Методы светозависимой активации и детекции клеточной гибели с помощью флуоресцентных белков» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук «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 заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник
лаборатории структурно-функциональной организации хромосом
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН),
доктор биологических наук (по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»)

Омар Леванович Кантидзе

/О.Л. Кантидзе/

23.08.2017

Контактные данные:

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5
Сайт: www.genebiology.ru
Тел.: (499)135-97-87
E-mail: kantidze@gmail.com



ПОДПИСЬ Кантидзе О.Л.
ЗАВЕРЯЮ Наборкина
Ученый секретарь ИБГ РАН Наборкина Е.Н.