

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Злобовской Ольги Анатольевны** «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»

Диссертационная работа О.А. Злобовской посвящена изучению процессов светозависимой активации клеточной гибели в культурах клеток млекопитающих с использованием генетически кодируемых GFP-подобных флуоресцентных белков – фотосенсибилизаторов KillerRed, KillerOrange, SuperNova и SuperNova-2, а также разработке сенсоров на активность каспазы-3, которая может служить в качестве критерия клеточной гибели путем апоптоза. Объединение этих двух направлений исследований в диссертационной работе вполне оправдано, поскольку эти две части работы объединены общим предметом исследования – изучением процессов клеточной гибели, и общим инструментом исследования – использованием GFP-подобных флуоресцентных белков, как для активации процессов клеточной гибели, так и при создании сенсоров для регистрации этих процессов.

Автором созданы и протестированы несколько вариантов дальнекрасно-ближнеинфракрасного FRET-сенсора на активность каспазы-3, в состав которых впервые, в качестве акцептора, вошел белок iRFP713 на основе бактериофитохрома с длинноволновым спектром поглощения и флуоресценции. Для наиболее успешного варианта сенсора (по результатам экспериментов *in vitro* и *in cellulo*) – mKate2-DEVD-iRFP – показана возможность его использования для мультиканальной флуоресцентной микроскопии. Проведенные эксперименты продемонстрировали, что созданный сенсор на активность каспазы-3 – перспективный инструмент для исследования механизма апоптоза, при этом его флуоресценция в дальнекрасной-ближнеинфракрасной области спектра делает сенсор подходящим для работы *in vivo*. Биосенсоры, созданные на основе GFP-подобных флуоресцентных белков, являются

мощным инструментом для визуализации целевых белков, их взаимодействия друг с другом с образованием надмолекулярных комплексов, а также для изучения различных функционально-значимых процессов, происходящих в живой клетке. При создании сенсоров на основе GFP-подобных флуоресцентных белков важно, что большинство флуоресцентных белков нетоксичны для клетки и их использование не нарушает функционально-значимых процессов. В то же время существует несколько генетически кодируемых флуоресцентных белков, обладающих фототоксичностью – KillerRed, KillerOrange, SuperNova и SuperNova-2, что может быть использовано для активации процессов апоптоза - запрограммированного "самоубийства" клетки во имя выживания организма. Изучение свойств этих белков существенно как для научных исследований процессов гибели клеток, так и, в принципе, в медицине для прицельного уничтожения клеточных популяций. Таким образом, все исследования, выполненные в рамках диссертационной работы, несомненно, актуальны.

Диссертационная работа построена по общепринятому плану, изложена на 124 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, выводы, заключение, список сокращений, список цитируемой литературы (198 источников) и Приложение. В целом работа хорошо иллюстрирована и содержит 50 рисунков и 1 таблицу.

Литературный обзор (Глава 1) состоит из двух разделов. В первом разделе раскрываются механизмы клеточной гибели под действием фотосенсибилизаторов. В настоящее время фотосенсибилизаторы используют для исследования клеточной гибели в научных целях и в медицине. В последнем случае, особенно важно, что использование фотосенсибилизаторов может обеспечить «правильный» тип клеточной смерти. Вначале автор рассматривает механизм действия фотосенсибилизаторов, дает характеристику активных форм кислорода, возникающих при их облучении светом, таких как синглетный

кислород, супероксид-анион радикал, пероксид водорода, гидропероксильный радикал и гидроксильный радикал. Затем, рассматривает различные механизмы клеточной гибели при воздействии света на фотосенсибилизаторы. Показано, что апоптоз, автофагия и некроз являются клеточными программами, играющими центральную роль в нормальном развитии, гомеостазе тканей и в удалении ненормальных или поврежденных клеток и кратко описана суть этих процессов. Все эти типы клеточной смерти возможны при фотодинамической терапии но, как справедливо замечает автор диссертации, не все желательны. Автор отмечает, что механизмы переключения клеточной гибели между некрозом и апоптозом, а также связи этих путей с автофагией сложны и не до конца изучены. Однако нет сомнений, что отслеживание этих процессов совершенно необходимо для разработки эффективных и максимально безопасных средств для фотодинамической терапии; при этом необходимо учитывать, что в опухолевых клетках один или несколько из этих путей могут быть нарушены. В заключении этой части обзора автор рассматривает преимущество генетически кодируемых фотосенсибилизаторов– флуоресцентных белков семейства KillerRed, по сравнению с химическими фотосенсибилизаторами. Рассматривает причины фототоксических свойств этих белков в отличие от всех других GFP-подобных белков, обсуждает области их применения, в том числе, применение *in cellulo* в различных локализациях и *in vivo*, а также их использовании в фотодинамической терапии, обосновывает преимущества использования мономерных белков SuperNova и SuperNova-2 по сравнению с димерным белком KillerRed.

Во второй части обзора автор подробно рассматривает один из видов клеточной смерти – апоптоз, механизмы развития апоптоза, рецептор-зависимый сигнальный путь, митохондриальный сигнальный путь, приводит сравнительный анализ структуры каспаз и их функций. В этой же части обзора дано описание FRET-сенсоров каспазной активности, созданных к моменту начала работы над диссертацией. Обзор литературы, представленный О.А.

Злобовской, хорошо написан и проиллюстрирован. Обзор, несомненно, имеет самостоятельную ценность и может быть рекомендован для студентов и молодых специалистов.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов. Впечатляет обилие генно-инженерных и молекулярно-биологических методов, которые необходимо было освоить и использовать автору для выполнения работы.

Основные результаты работы и их обсуждение изложены в Главе 3. Первая часть работы посвящена сравнительному исследованию производных генетически кодируемого фотосенсибилизатора KillerRed – KillerOrange, SuperNova и SuperNova-2 – на наличие фототоксичности для клеток млекопитающих. Показано, что, как и следовало ожидать, из сравнения спектров поглощения этих белков, KillerOrange проявил фототоксические свойства при облучении синим, но не оранжевым светом, и наоборот, KillerRed проявил фототоксические свойства при облучении оранжевым, но не синим светом. Существенно, что два белка с примерно одинаковым фототоксическим эффектом имеют различные спектральные характеристики. Установлено, что максимальный фототоксический эффект возникает при митохондриальной локализации этих фотосенсибилизаторов. Оба эти белка имеют один и тот же недостаток, связанный с тем, что они являются димерами. Это ставит под вопрос их использование для технологии светоиндуцируемой инактивации целевых белков (Chromophore-Assisted Light Inactivation, CALI). В работе были исследованы два мономерных белка SuperNova и SuperNova-2, недавно полученный в Лаборатории К.А. Лукьянова. Показано, что SuperNova-2 по ряду характеристик (квантовый выход флуоресценции, коэффициент молярной экстинкции) превосходит белки KillerRed и SuperNova. Вариант SuperNova-2 наследует от SuperNova мономерное строение, а от KillerRed – высокую скорость созревания и сходную с ним фототоксичность, что делает SuperNova-2 потенциально перспективным инструментом, как для достижения клеточной гибели, так и для технологии CALI.

Во второй части работы автором были сконструированы и протестированы несколько вариантов дальнекрасно-ближнеинфракрасного сенсора на активность каспазы-3 - ключевого участника апоптоза, в основе которого лежит Ферстеровский перенос энергии. В состав этих сенсоров впервые вошел белок на основе бактериофитохрома iRFP713, имеющий более длинноволновые спектры поглощения и флуоресценции по сравнению со всеми GFP-подобными флуоресцентными белками. Флуоресценция iRFP713 в дальнекрасной-ближнеинфракрасной области спектра делает данный сенсор подходящим для работы *in vivo*. Показано, что наиболее перспективным инструментом для исследования механизма апоптоза оказался сенсор на активность каспазы-3 – mKate2-DEVD-iRFP. В целом работа объединяет два больших раздела развития технологий на основе флуоресцентных белков: возможность применения фотосенсибилизаторов для достижения клеточной гибели и создание новых генетически-кодируемых сенсоров.

У меня нет серьезных замечаний по сути работы. Хотелось бы обсудить установленный автором факт неравномерного распределения сенсоров на каспазу-3 FP650-DEVD-iRFP в цитоплазме клеток СТ26 и НЕК293. Автор сообщает о том, что FP650-DEVD-iRFP в клетках СТ26 и НЕК293 может дополнительно формировать яркие «фокусы», распределенные по цитоплазме. Автор отмечает, что если клетка находится в оптимальной питательной среде, то «фокусы» возникают редко (не более 0.5% клеток). «Фокусы» появляются при обрабатывании клеток стауроспорином или смене среды на раствор, обедненный питательными веществами, а также на раствор с рН, отличающимся от физиологического значения (как в меньшую, так и большую сторону). В последних двух случаях «фокусы» исчезают, и сенсор вновь распределяется равномерно по цитоплазме через несколько минут после возвращения клеток в питательную среду с рН 7.4. Автор сообщает, что природа формирования «фокусов» до конца не ясна; и предполагает, что это агрегаты сенсора, поскольку оба белка (и донор, и акцептор) в составе химерного

являются димерными. Возможно, однако, что дело не в димерном характере донора и акцептора, а в том, что в условиях макромолекулярного краудинга в клетке при стрессе могут возникать немембранные образования с гораздо большей концентрацией клеточных компонентов. Не обусловлены ли яркие образования, которые автор называет "фокусами", неоднородностью внутриклеточной среды?

К недостатку работы можно отнести не слишком хорошее изложение материала. Встречается много неудачных фраз. Приведу лишь некоторые:

Стр. 4. Постепенно **флуоресцентная палитра пополняется белками (?!) из других семейств, требующими дополнительные кофакторы для образования функционального хромофора, но зато позволяющими приблизиться к инфракрасной области спектра**

Стр. 4. Дальнекрасная и инфракрасная **области спектра флуоресценции особо актуальны** для работы на уровне целых организмов, поскольку свет в данной области меньше всего поглощается и рассеивается тканями.

Стр. 4....**текущие** (вместо "существующие в настоящее время") фотосенсибилизаторы – в продолжении изучения и возможном улучшении их свойств.

Стр. 5. Для **выполнения цели (?)** были поставлены следующие задачи:

Стр. 84. При **вызывании (?!) клеточной гибели с помощью фотосенсибилизатора необходимо не просто добиться смерти клетки, а вызвать определенный тип клеточной гибели**

Стр. 84. **В значительном количестве клеточных культур...** (вместо "для большинстве клеточных культур")

Стр. 105. **Отслеживание (?)** изменения кислотности среды и активности каспазы-3 при активации апоптоза стауроспорином и цисплатином....

Конечно, во всех случаях, можно понять, о чем идет речь, но лучше стараться излагать материал литературным русским языком. Впрочем, эти замечания касаются, в основном, оформления диссертации и изложения

материала и не ставят под сомнение научные результаты, полученные в работе. Автореферат диссертации адекватно отражает содержание проделанной работы. Сделанные выводы достоверны, четко сформулированы и не вызывают сомнений. Основные материалы диссертационной работы опубликованы в российских и международных научных журналах (5 статей, 1 патент) и представлены на нескольких научных конференциях. В целом диссертационная работа О.А. Злобовской 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
заведующий Лабораторией структурной динамики,
стабильности и фолдинга белков Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ
РАН), доктор физико-математических наук, профессор по
специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»


К.К. Туроверов

Контактные данные:

Адрес: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., дом 4

Сайт: www.incras.ru

Тел.: (812)297-19-57

E-mail: kkt@incras.ru

Подпись докт. физ.-мат. наук
Туровой Константина Константиновича
заверяю
Ученый секретарь ИНЦ РАН



И.И. Тюреева