

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
**ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н.Баха**  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; e-mail: inbi@inbi.ras.ru

28.04.2014 № 12307-2171-241

На № \_\_\_\_\_

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор

Института Биохимии им. А.Н.Баха РАН,

Чл.-корр. РАН, профессор, д.х.н.,

ПОПОВ В.О.

“28” апреля 2014 г.



ведущей организации на диссертацию 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.

Современные достижения в области прижизненной визуализации позволяют проводить непрерывный визуальный мониторинг многочисленных процессов, происходящих в живых интактных организмах на клеточном и молекулярном уровнях, а также колебаний количества различных низкомолекулярных веществ, происходящих вследствие этих процессов. Диссертационная работа Билана Д.С. посвящена важной теме - созданию и применению флуоресцентных белковых биосенсоров для детекции активных форм кислорода, а также окислительно-восстановительного состояния адениновых динуклеотидов. Данная тематика чрезвычайно важна для медицины, так как окислительный стресс и нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках и тканях лежат в основе

патогенеза большого количества заболеваний. Помимо этого, свободные радикалы кислорода инициируют ошибки генома, повреждают структуру белков и приводят к общему дисбалансу в организме. Попытка этого избежать путем использования антиоксидантов не привела к положительным результатам. Стало понятно, что совокупность окислительно-восстановительных процессов в клетке весьма сложна, и воздействовать на них ненаправленными антиоксидантами неэффективно.

Разработанный ранее биосенсор HyPer позволил наблюдать за продукцией  $H_2O_2$  в живых объектах. Однако данный сенсор обладает низким динамическим диапазоном измерений, а его улучшенный вариант HyPer-2 – низким временем отклика на изменение концентрации пероксида водорода.

Автором был получен новый вариант биосенсора пероксида водорода HyPer-3. Он обладает большим по сравнению с HyPer и сравнимым с HyPer-2 динамическим диапазоном ответа, но при этом его скорости окисления и последующего восстановления существенно выше, что делает HyPer-3 более предпочтительным инструментом для регистрации быстрых колебаний  $H_2O_2$  в живых системах. Тестирование HyPer-3 в системе *in vivo* на модели раны хвостового плавника *Danio rerio* продемонстрировало, что предпочтительнее использовать именно HyPer-3 с его более контрастным ответом по сравнению с HyPer. Кроме того, впервые на примере биосенсоров HyPer и HyPer-3 было показано, что время жизни флуоресценции может зависеть от изменения окружения хромофора в одно-флуорофорных сенсорах. Оба сенсора были успешно применены для регистрации  $H_2O_2$  *in vivo* с использованием микроскопии в режиме FLIM.

Однако автор, к сожалению, проводил детекцию времени жизни флуоресценции только с помощью фазово-модуляционной техники, что значительно сузило возможности интерпретации данных, поскольку данный подход не позволяет проводить разложение многоэкспоненциальной кинетики затухания флуоресценции на отдельные компоненты. Помимо этого, автору следовало бы провести оценку ложно-положительного результата срабатывания сенсора в результате колебаний количества FAD в живой системе, сопряженного с редокс-статусом клетки. Кроме того, автор изучает отклик сенсора только при добавлении пероксида водорода извне, тогда как более логичным выглядело бы построение

физиологической модели стимуляции клетки и индукция естественного окислительного стресса и сравнение отклика сенсора с результатами измерения уровня  $H_2O_2$  независимыми методами.

Автором также был создан биосенсор RexYFP для регистрации динамики изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в живых системах, который представляет собой конструкцию на основе бактериального белка T-Rex из *Thermus aquaticus* и интегрированного в его последовательность пермутированного желтого флуоресцентного белка cpYFP, а также был разработан подход, позволяющий устранять влияние колебаний pH на сигнал сенсора. RexYFP был охарактеризован в системе *in vitro* и протестирован в клетках эукариот. Данный биосенсор отличается от аналогов меньшим размером, а также на данный момент является единственным биосенсором, с помощью которого можно регистрировать динамику изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН как в цитоплазме, так и в митохондриях клеток, то есть позволяет сравнивать динамику этого параметра в двух ключевых компартментах клетки.

Логичным продолжением данной работы представляется создание аналогичных сенсоров на основе пермутированного красного белка, что позволило бы минимизировать фоновый сигнал и увеличить глубину проникновения сигнала сенсора.

Полученные результаты обладают несомненной значимостью для науки, медицины и фармакологии. Сенсоры, разработанные автором, могут использоваться в фундаментальных научных исследованиях, а также для поиска и отбора новых лекарственных препаратов, направленных на системы продукции и утилизации АФК и других редокс-активных веществ.

Диссертация написана по традиционному плану - работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 304 ссылки. Диссертация изложена на 127 страницах и содержит 35 рисунков. Материал диссертации изложен последовательно, результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют и логически развивают положения, установленные автором ранее. Исследование проведено на высоком

методическом уровне, проделан большой объем работы. Надежность и достоверность полученных данных обеспечивается квалифицированным применением современных молекулярно-биологических, биохимических и спектральных методов исследований. Сделанные выводы хорошо аргументированы. Диссертационная работа носит полноценный и завершённый характер как в научном плане, так и в оформлении. Результаты диссертационной работы докладывались на международных и российских научных конференциях и опубликованы в российских и зарубежных журналах (всего 4 работы и 2 патента РФ).

Обзор литературы адекватно отражает положение дел в области исследований активных форм кислорода в биологии и методов их детекции. Цели работы, усовершенствование генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора для пероксида водорода HyPer, а также создание флуоресцентного генетически кодируемого сенсора на основе бактериального белка T-Rex (*Thermus thermophilus*) и пермутированного желтого флуоресцентного белка cpYFP для исследования динамики изменения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в живых системах, соответствуют поставленным задачам. Раздел, посвященный методам исследования, в основном содержит описание стандартных методов молекулярной биологии и микроскопии и достаточно полно отражает спектр использованных методик. Результаты исследования полностью соответствуют поставленным задачам и выводам, а их изложение в диссертации - изложению в автореферате. Достоверность полученных данных не вызывает сомнения. В целом, диссертационная работа соответствует заявленной специальности Молекулярная биология - 03.01.03.

Такие результаты исследования, как усовершенствование структуры генетически кодируемого сенсора пероксида водорода и создание сенсора для детекции НАД<sup>+</sup>/НАДН, можно квалифицировать как научные достижения, имеющие как фундаментальное, так и прикладное значение для молекулярной биологии, биомедицины и фармакологии.

Результаты исследования могут быть использованы в различных институтах РАН и РАМН (Институт биохимии имени А.Н.Баха РАН, Институт биологии гена

РАН, Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институт канцерогенеза РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Институт общей генетики им. Н.А. Вавилова РАН, Институт цитологии РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН), на биологическом и химическом факультетах Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова и Санкт-Петербургского Государственного Университета, а также других профильных институтах и университетах России и всего мира.

Высказанные замечания не умаляют значения полученных в работе результатов. По всем критериям данная работа отвечает требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а ее автор, Билан Дмитрий Сергеевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и утвержден на совместном семинаре лабораторий физической биохимии, аналитической биохимии и молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук», протокол №1 от 25 апреля 2014 года.

Заведующий лабораторией физической биохимии,  
доктор химических наук, профессор

Савицкий А.П.

\_28\_ апреля 2014 г.

