

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биологии гена Российской академии наук  
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05

e-mail: [info@genebiology.ru](mailto:info@genebiology.ru); <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального государственного  
учреждения науки

Институт биологии гена РАН

академик Ц.Г. Георгиев



» мая 2022 г.

ОТЗЫВ ведущей организации

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук **Горбачева Дмитрия Андреевича**

на тему: «Новые генетически кодируемые фотосенсибилизаторы»

по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

#### Актуальность темы выполненной работы

Фотосенсибилизаторы – красители, способные вырабатывать активные формы кислорода при облучении светом, приводить к окислению органических молекул и гибели клеток. Фототоксичные флуоресцентные белки — группа генетически кодируемых фотосенсибилизаторов, которые характеризуются более низким по сравнению с органическими фотосенсибилизаторами уровнем фототоксичности. На сегодняшний день число таких белков невелико: были описаны только несколько зеленых и красных вариантов, в связи с чем расширение панели доступных фототоксичных белков других цветов и с улучшенной фототоксичностью является актуальной задачей как для фундаментальных исследований, так и для биомедицины. Целью работы являлось создание нового генетически кодируемого фотосенсибилизатора KillerOrange, активируемого синим светом, а также создание нового варианта белка SuperNova с увеличенной фототоксичностью.



## **Общая характеристика и структура диссертационной работы**

Работа построена по стандартной схеме и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результатов, их обсуждения, выводы и список цитируемой литературы. Текст изложен на 90 страницах, содержит 45 рисунков, 1 таблицу и 122 ссылки на литературные источники.

Введение содержит описание актуальности, новизны, практической значимости исследования, а также его цели и задачи. Дополнительно приведена информация об опубликованных по теме исследования работах и докладах на конференциях.

Обзор литературы написан кратко и лаконично, хорошо проиллюстрирован. Автор приводит структуру и механизм созревания хромофора нефототоксичных и фототоксичных флуоресцентных белков, описывает их структурные и функциональные отличия, механизмы образования активных форм кислорода, а также приводит подробное описание свойств существующих фототоксичных белков. Обзор литературы содержит необходимую информацию для понимания принципов действия генетически кодируемых фотосенсибилизаторов, степени проработанности данной темы и необходимости получения новых вариантов.

Раздел “Материалы и методы” содержит необходимую информацию по использованным молекулярно-биологическим процедурам, описывает детали проведения разработанных в ходе работы тестов на фототоксичность, измерению скорости созревания хромофоров, выделению и очистке полученных белков и измерению их спектров поглощения и флуоресценции.

Результаты и обсуждение содержат описание полученных экспериментальных результатов и их интерпретацию. Работа поделена на две части. Первая описывает создание белка KillerOrange, вырабатывающего активные формы кислорода независимо от KillerRed, путем проведения его направленной эволюции. Горбачев Д.А. показал, что KillerOrange активируется синим светом и сопоставим с KillerRed по фототоксичности.

Вторая часть работы была сфокусирована на изучении характеристик красных флуоресцентных белков KillerRed и SuperNova, влияющих на их фототоксичность. Автор показал, что изменение одного из важных параметров – увеличения эффективности созревания красного хромофора – приводит к росту фототоксичности белков KillerRed и SuperNova.

## **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**



В результате работы были созданы новые фототоксичные белки KillerOrange и mKillerOrange, пригодные для использования совместно с KillerRed для независимой элиминации разных групп клеток млекопитающих или бактерий. Помимо этого, впервые было показано, что внесение одной аминокислотной замены S10R в белки KillerRed SuperNova приводит к увеличению скорости и полноты созревания красного хромофора, что вызывает увеличение фототоксичности. Это позволит расширить возможности их применения и снизить дозы облучения при сохранении фототоксичного эффекта, что уменьшит неспецифическое воздействие света на клетки и ткани при облучении.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследования**

Исследование проведено на высоком методическом уровне, использованы современные методы молекулярной и клеточной биологии, генетической инженерии. В ходе работы был разработан собственный метод для оценки фототоксичности фотосенсибилизаторов в разных популяциях клеток. Достоверность приведенных данных подтверждена статистически.

### **Вопросы.**

Несколько моментов рассматриваемой работы вызывает вопросы.

*Вопрос №1.* Почему соискатель, получив кривые зависимости выживаемости клеток от дозы облучения для разных фототоксичных белков (Рис. 39, 40, 43 диссертации), оценивал достоверность различия в цитотоксичности этих белков по выживаемости для некоторых доз облучения, но не кривые в целом по таким их характеристикам, как например,  $D_0$ ,  $EC_{50}$  и т.п., как это обычно делается [Tarone R.V. et al. Statistical methods for in vitro cell survival assays. *Mutation Res.*, 1983, 111: 79-96; West C.M.L., Moore J.V. Cell survival characteristics of a human colon adenocarcinoma cell line after photodynamic treatment : a comparison of Photofrin II and TPPS. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1988, 54: 621-634]?

*Вопрос №2.* Какие конкретно сигналы мембранной и митохондриальной локализации соискатель использовал для создания фотоцитотоксичных белков с соответствующей локализацией? В диссертации на стр. 47 можно увидеть лишь следующую информацию:

“Было создано девять стабильных клеточных линий HeLa Kyoto, экспрессирующих трансгены с одной из генетических конструкций:

– CMV промотор – сигнал митохондриальной локализации – фотосенсибилизатор – T2A TagBFP2 – сигнал ядерной локализации,



- СAG промотор – сигнал мембранной локализации – фотосенсибилизатор – T2A TagBFP2 – сигнал ядерной локализации,
- CMV промотор – EGFP – сигнал ядерной локализации (нефототоксичный контроль)”.

### **Заключение**

Диссертационная работа Горбачева Дмитрия Андреевича соответствует критериям (в том числе п. 9), 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; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу Дмитрия Андреевича Горбачева «Новые генетически кодируемые фотосенсибилизаторы» рассмотрен, обсужден и одобрен единогласно на семинаре лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена РАН 30 мая 2022 года.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, 119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5, Телефон: +7 (499) 135-60-89, E-mail: [info@genebiology.ru](mailto:info@genebiology.ru), сайт: [www.genebiology.ru](http://www.genebiology.ru).

Отзыв составил член-корреспондент РАН, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Соболев Александр Сергеевич 31 мая 2022 года.

E-mail: [sobolev@genebiology.ru](mailto:sobolev@genebiology.ru)

**СОБОЛЕВ Александр Сергеевич**

Подпись Соболева А.С. заверяю

Ученый секретарь Института биологии гена РАН  
доктор биологических наук



Е.Н. Набировкина