



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2

Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32

www.fbras.ru, info@fbras.ru

На № 22.02.2024 от № 85-01-19/739

Г «УТВЕРЖДАЮ» 7

Директор Федерального
государственного учреждения
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН

д.б.н. Федоров А.Н.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН на диссертационную работу Марынич Надежды Константиновны «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненную в лаборатории физической биохимии Института биохимии имени А.Н.Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

В 2019 году Марынич Надежда Константиновна окончила кафедру химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия». С 2014 г. Надежда Константиновна работает в лаборатории физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук. В 2019 году Надежда Константиновна поступила в очную аспирантуру и на должность младшего научного сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. В 2023 г. Марынич Н.К. присвоена квалификация «Исследователь. Преподаватель-исследователь» (диплом об окончании аспирантуры 107705 0002684). Все кандидатские экзамены сданы.

Научный руководитель – доктор химических наук, профессор Савицкий Александр Павлович, заведующий лабораторией физической биохимии, Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

По результатам рассмотрения диссертации «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» принято следующее заключение:

Актуальность работы

Данная работа посвящена получению и модификации доноров и акцепторов FRET-сенсоров для различных приложений. Также проработано фундаментальное понимание свойств GFP-подобных белков для рационального применения.

Открытие GFP как генетически-кодируемой метки, получение палитры флуоресцентных белков, применение фототрансформируемых белков в современных методах микроскопии привело к тому, что флуоресцентный имиджинг стал важным подходом в исследовании внутриклеточных процессов. GFP-подобные флуоресцентные белки сами по себе являются интересным объектом исследования, поэтому создание оптимальной метки для применения в требуемом методе является нетривиальной задачей. Явление флуоресцентного резонансного переноса энергии между флуоресцентными белками нашло широкое применение для исследования процессов комплексообразования, фолдинга белков, а также протеазной активности. Создание эффективного, мономерного сенсора для применения во всех компартментах клетки является важной задачей. Обнаружение протеолиза является одним из самых важных применений FRET-сенсоров, поскольку роль различных протеаз в молекулярной онкологии, развитии вирусов (например, SARS-CoV-2), воспалительных процессов находится в стадии тщательного изучения и может способствовать поиску новых лекарственных мишеней.

Целью являлась разработка методов создания FRET-сенсоров на основе фотоконвертируемого белка SAASoti и хромопротеина на примере каспазы 3 для последующего применения в методах субдифракционной микроскопии и флуоресцентной корреляционной спектроскопии.

Научная новизна

SAASoti является уникальным бифотохромным флуоресцентным белком. Впервые он был обнаружен как фотоконвертируемый белок, затем были открыты свойства фотопереключения в диком типе белка. Это отличает его от других представителей бифотохромных белков, так как в них эти свойства были введены генно-инженерными методами. Также сотрудниками нашей лаборатории была получена мономерная форма этого белка, успешно применявшаяся в методах PALM и ФКС. В этой работе впервые был получен бесцистеиновый вариант SAASoti, а также оптимизированы его свойства фотоконверсии и созревания при 37 °С. Также подобран и охарактеризован мономерный акцептор флуоресценции – хромопротеин. Впервые получена кристаллическая структура moxSAASoti с разрешением 1,9 Å.

Теоретическая и практическая значимость

Понимание и рациональное управление свойствами ФБ является важным шагом для создания оптимальных генетически-кодируемых флуоресцентных меток. Создание мономерного и эффективного FRET-сенсора для применения в методе ФКС может стать началом в разработке скрининг системы для анализа эффективности противоопухолевых препаратов.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Автор принимал непосредственное участие в постановке научных задач, планировании и

проведении экспериментов, анализе полученных результатов и их представлении. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя является определяющей.

Степень достоверности

Достоверность представленных в диссертации Марынич Н.К. данных и сделанных выводов обеспечена использованием современных методов исследования, проведением независимых экспериментов с использованием положительных и отрицательных контролей, и подтверждается воспроизводимостью значений измерений. Все эксперименты проводились на сертифицированном оборудовании. Полученные данные анализировали с использованием современных методов статистической обработки.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Содержание диссертационной работы и опубликованные по ней материалы соответствуют специальности 1.5.4. Биохимия, результаты диссертационного исследования изложены в опубликованных работах.

Апробация работы

Основные результаты диссертации изложены в 4 оригинальных статьях в международных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных конференциях (Ломоносов 2020 в Москве в 2020 году; XXXIV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии в Москве в 2022 году; VII съезд биохимиков России в Сочи в 2022 г.; OASIS 8. International Conference & Exhibition on Optics & Electro-Optics, Тель-Авив, Израиль в 2022 году; 13-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применение» в Суздале в 2023 году).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени.

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, и 7 тезисов, опубликованных в материалах конференций, которые приведены ниже.

Список публикаций

Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. Marynich N. K., Khrenova M. G., Gavshina A. V., Solovyev I. D., Savitsky A. P., First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment // Scientific Reports. – 2022 – Vol. 12(1). – P. 7862. IF 3,8
2. Марынич Н.К., Грановский И.Э., Савицкий А.П. Новые FRET-пары флуоресцентных белков для определения активности каспаз in vitro // Прикладная биохимия и микробиология – 2022. – Т. 58(6). – С. 592-597. IF 1,7
3. Марынич Н.К., Савицкий А.П. Определение «горячих точек» для улучшения созревания флуоресцентного белка moxSAASoti при 37 °С // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 3. С. 255–261. IF 0,78
4. Marynich N.K., Boyko K.M., Matyuta I.O., Minyaev M.E., Khadiyatova A.A., Popov V.O., Savitsky A.P. Single-point substitution F97M leads to in cellulo crystallization of the biphotochromic protein moxSAASoti // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – V. 732 (). – P. 150419. IF 2,5

Тезисы докладов:

1. **Марынич Н.К.**, Создание биосенсора на основе FRET-пары TagRFP-хромобелок: подбор оптимального хромобелка. //Материалы XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», секция «Химия» – М.: Издательство «Перо» – 2020. – С. 1568
2. **Марынич Н.К.**, Гавшина А.В., Савицкий А.П. moxSAASoti: первый бифотохромный флуоресцентный белок, устойчивый в окислительных условиях, для применения в суперразрешающей микроскопии. // Сборник тезисов XXXIV Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии – М.: ИБХ РАН – 2022. – С. 27
3. **Марынич Н.К.**, Савицкий А.П., Хренова М.Г. Выбор оптимального хромобелка в качестве акцептора во FRET паре. // Научные труды. VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021) – М.:Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 296.
4. Меерович И.Г., **Марынич Н.К.**, Грановский И.Э., Фикслер Д., Савицкий А.П. Получение комплексов на основе золотых наночастиц и FRET-сенсоров каспазы 3 на основе флуоресцентных белков. // Научные труды. VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021) – М.:Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 292.
5. Хренова М.Г., А.В. Гавшина, И.Д. Соловьев, **Марынич Н.К.**, Савицкий А.П. Влияние динамических свойств фотопереключаемых и фотоконвертируемых белков семейства SAASoti на фотофизические и фотохимические свойства. // Научные труды. VII съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2022) – М.:Издательство «Перо». – 2022. – Т. 3. – С. 74.
6. Savitsky A.P., Solovyev I.D, Meerovich I.G., Granovsky I.E., **Marynich N.K.**, Tuchina D.K., Konovalov A.B., Vlasov V.V., Tuchin V.V. Multimodal MRI and life-time fluorescence sensors for theranostic applications. // OASIS 8. International Conference & Exhibition on Optics & Electro-Optics, Tel-Aviv, Israel 12-13 December 2022. Digital Abstract Book – 2022. – P. 52
7. **Марынич Н.К.**, Грановский И.Э., Савицкий А.П. Создание FRET-сенсоров флуоресцентный белок-хромопротеин для детекции активности каспазы 3 in vitro и in vivo. // Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, 25-29 июня 2023 г.) – М.: Издательство «Адмирал принт». – 2023. – С. 107

Рекомендуемые оппоненты:

Феофанов Алексей Валерьевич, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Субач Оксана Михайловна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейронаук Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»».

Рекомендуемая ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Диссертация «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» Марынич Надежды Константиновны на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий физической биохимии, инженерной энзимологии, биохимии стрессов микроорганизмов, молекулярной генетики, молекулярного имиджинга и группы молекулярного моделирования Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», протокол №2 от «1» февраля 2024 года. Присутствовало на семинаре – 31 человек. Результаты голосования: «за» - 31 человек, «против» - нет, «воздержалось» - нет.

Председатель совместного семинара лабораторий

Руководитель группы геномного редактирования промышленных микроорганизмов,
доктор биологических наук,

М.О. Агафонов

Секретарь

Руководитель группы молекулярного моделирования,

доктор физико-математических наук, профессор РАН

М.Г. Хренова

22/02.2024

Подпись М.О. Агафоновой заверено:
Подпись М.Г. Хреновой заверено:

