

ОТЗЫВ

Официального оппонента Субач Оксаны Михайловны на диссертационную работу Марынич Надежды Константиновны на тему «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность избранной темы

За последние несколько десятилетий генетически-кодируемые флуоресцентные белки произвели революцию в клеточной биологии. Эти белки сворачиваются и становятся флуоресцентными за счет образования флуорофора из аминокислотных остатков в присутствии кислорода. Интенсивная инженерия этих белков привела к созданию большого разнообразия флуоресцентных белков различных цветов, охватывающих видимый спектр, что позволяет получать многоцветные изображения практически любого набора представляющих интерес белков путем генетического слияния флуоресцентных белков с интересующими белками. Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения позволяет изучать биологические процессы в масштабах, достаточно малых, чтобы визуализировать мелкие субклеточные структуры, которые неразрешимы с помощью традиционной световой микроскопии с дифракционным ограничением. Разработка новых фотоконвертируемых, фотоактивируемых и фотопереключаемых флуоресцентных белков с улучшенными свойствами необходима для микроскопии сверхвысокого разрешения. Явление флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) между флуоресцентными белками широко используется для создания генетически-кодируемых сенсоров, с помощью которых можно детектировать низкомолекулярные вещества, например, нейромедиаторы, протеазную активность, а также наблюдать за различными клеточными процессами. Создание эффективного, яркого и мономерного сенсора для применения во всех компартментах клетки, включая органеллы с окислительным окружением, является важной задачей. Создание сенсоров на активность различных протеаз является

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности темы исследования, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость работы, степень достоверности и апробация результатов, включающая опубликованные статьи и доклады на конференциях.

«Обзор литературы» включает данные о различных классах флуоресцентных белков, включая фотоактивируемые, фотоконвертируемые, фотопереключаемые, бифотохромные белки и хромопротеины. Также рассмотрены FRET-пары флуоресцентных белков, роль остатков цистеина во флуоресцентных белках и влияние различных аминокислотных замен на созревание флуоресцентных белков. Кроме того, уделено внимание различным видам апоптоза и субстратам каспаз.

Глава «Материалы и методы» подробно описывает стандартные процедуры, использованные при проведении исследований. Автор демонстрирует использование большого арсенала современных методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии и физической химии, таких как: сайт-направленный и сайт-насыщающий мутагенез, очистка и характеристика белков, методы высокоэффективной жидкостной хроматографии, гель-фильтрации и динамического рассеяния, определение времени жизни флуоресценции.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из нескольких больших частей и содержит основные результаты работы. На первом этапе был выбран оптимальный хромопротеин в качестве акцептора для FRET-пары с ярким красным флуоресцентным белком TagRFP. На роль нового нефлуоресцирующего акцептора были отобраны несколько хромопротеинов: Ultramarine, anm2CP, gfasCP, spisCP. Для FRET-пары был выбран хромопротеин Ultramarine, так как из четырех белков он один оказался мономером, и был создан сенсор апоптоза TagRFP-23-Ultramarine, в котором в линкере из 23 аминокислотных остатков содержался сайт узнавания каспазы 3. Сенсор TagRFP-23-Ultramarine имеет высокую эффективность FRET 54% и гидролизуетея каспазой 3. На основании этого сенсора возможна разработка сенсоров на другие протеазы, например, на протеазы коронавируса SARS-CoV-2.

На следующем этапе работы был получен полностью бесцистеиновый мутант бифотохромного флуоресцентного белка mSAASoti, названный moxSAASoti-T. Бифотохромный белок может фотоконвертироваться из зелёной

флуоресцентной формы в красную при облучении ультрафиолетовым светом. Кроме того, зелёная и красная формы могут фотопереключатся из тёмного во флуоресцентное состояния. Были измерены и проанализированы основные физико-химические и спектральные свойства (максимумы возбуждения/испускания $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, значения pK_a хромофора, молярный коэффициент экстинкции (ϵ) и квантовый выход (ϕ)) moxSAASoti и других вариантов mSAASoti с заменами аминокислотных остатков цистеинов. Кроме того, применялся метод молекулярной динамики для расчёта влияния окружения хромофора на pH-стабильность хромофора в этих белках. Было предположено, что изменения в окружении хромофора могут влиять на свойства фотоконверсии, фотопереключения и стабильности красной формы белка. Затем был проведён сайт-направленный мутагенез для улучшения яркости и стабильности красной формы moxSAASoti и улучшения его созревания при 37°C. Объединение замен в положениях 97 и 74 привело к получению варианта moxSAASotiF97M/H74K с яркой и стабильной красной формой и улучшенным созреванием при 37°C. Полученный бесцистеиновый белок может быть использован в органеллах с окислительным окружением, таких как эндоплазматический ретикулум, так как отсутствие цистеинов повышает устойчивость белка к окислительным условиям. На основе разработанного бифотохромного белка moxSAASotiF97M/H74K был получен FRET-сенсор апоптоза moxSAASotiF97M/H74K-23-Ultramarine, который имеет эффективность FRET 18% и гидролизуетея каспазой 3. Кроме того, в работе была получена структура moxSAASotiF97M с разрешением 1,9 Å. Новая кристаллическая структура moxSAASoti F97M может быть применена для дальнейшего улучшения свойств белка.

Диссертационная работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». Все научные положения, заключения и выводы достоверны, обоснованы, новы и полностью отражают полученные научные результаты.

В целом, работа выполнена на самом высоком научном уровне.

Замечания к работе:

1. В разделе Обзор литературы, главе 1.1.4.1. Метод случайного и сайт-направленного мутагенеза из фотоконвертируемых ФБ, с. 27 написано: “Новый вариант расширил границы применения ФТФБ, позволяя, например, использовать IrisFP для хранения четвертичных данных”. Непонятно, что такое “четвертичные данные”.
2. В разделе Материалы и методы, с. 52: “Буфер Б1 (гидрофобная хроматография): 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)”, а на с. 64: “Элюирование производили по схеме:
1.30% буфера Б
2.градиент 30-100% буфера Б.”
Буфер Б отсутствует в описании.
3. В разделе Результаты и обсуждение, глава 3.1, с. 75 написано: “Методами гель-фильтрации и ДСР показано, что полученный сенсор является димером, то есть оба белка в сенсоре находятся в мономерном состоянии.” На самом деле, результаты показывают, что сенсор является мономером.
4. В разделе Результаты и обсуждение, с. 86, Рисунок 16: на рисунке изображены 4 панели с названиями А, А, В, В, а в подписи к рисунку и в тексте описываются панели с названиями А, Б, В, Г.
5. В разделе Результаты и обсуждение, в конце главы 3.6, с. 108 написано: “Свободный белок и сенсор были экспрессированы в клетках HeLa для дальнейшего анализа.” Но в дальнейшем описание поведения белка и сенсора в животных клетках отсутствует.
6. В разделе Результаты и обсуждение проведена оценка олигомерного/мономерного состояния некоторых промежуточных белков moxSAASoti, но отсутствует оценка олигомерного/мономерного состояния конечного бифотохромного белка moxSAASoti F97M/H74K и сенсора на его основе moxSAASoti F97M/H74K -23-Ultramarine.

Заключение о соответствии работы критериям, установленным требованиям

Диссертационная работа Марынич Надежды Константиновны «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» соответствует требованиям

пунктов «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Официальный оппонент:

кандидат химических наук,
старший научный сотрудник лаборатории молекулярного конструирования Курчатовского комплекса нано-, био-, информационных и когнитивных наук и природоподобных технологий
Федерального государственного бюджетного учреждения Национального исследовательского центра "Курчатовского института"
Субач Оксана Михайловна

/О.М. Субач/

3 февраля 2025 г.

Контактные данные:

Тел.: +7 (915)2861123,

e-mail: subach_om@nrcki.ru

Адрес места работы:

123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Подпись сотрудника
НИЦ "Курчатовский институт" Субач О.М.
«Удостоверяю»
Первый заместитель Главного
Ученого секретаря
Национального исследовательского центра
"Курчатовский институт"
к.ф.-м.н.



Борисов Кирилл Евгеньевич

3 февраля 2025 г.