

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук
(ИБХФ РАН)

Косыгина ул., д. 4, Москва, 119334,
Тел.: (499) 137-64-20, факс: (499) 137-41-01
E-mail: ibcp@sky.chph.ras.ru

ОКПО 40241274, ОГРН 1037739274308

ИНН/КПП 7736043895/773601001

на № 21.01.2025 от № 1243 - 6215 /31

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук
д.х.н., профессор Курочкин Илья Николаевич



«21» января 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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 темы исследования

В настоящее время множество лабораторий используют GFP-подобные белки и сенсоры на их основе для исследования фундаментальных свойств живых систем. Эти белки позволяют работать на живых клетках и наблюдать за биологическими процессами в режиме реального времени. Особое значение приобрели фотопревращающиеся белки, позволяющие благодаря своим свойствам получать изображения с суперразрешением за пределами дифракционного барьера. Комбинация GFP-подобных белков между собой и успешное применение в различных методах микроскопии и спектроскопии во многом зависит от понимания зависимости свойств этих белков от их структуры. Поэтому несмотря на довольно обширный опыт разработки инструментов на основе этих белков, они всё еще остаются сложным и интересным объектом для изучения, предсказание свойств которого является нетривиальной задачей.

Целью диссертационного исследования Марынич Н.К. являлась разработка методов создания FRET-сенсоров на основе фотоконвертируемого белка SAASot1 и хромопротеина на примере каспазы 3 для последующего применения в методах субдифракционной микроскопии и флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Известно, что для протеазного FRET-сенсора важна контрастность сигнала, которая обеспечивается эффективным переносом энергии. Для этого нужно подобрать донор и акцептор так, чтобы получить максимальный интеграл перекрытия, при этом, чтобы донор характеризовался высоким значением квантового выхода, а акцептор — коэффициентом молярной экстинкции. В работе Марынич Н.К. проанализированы все эти параметры, проведена большая работа по мутагенезу донора и получен донор с возросшим квантовым выходом, подобран мономерный акцептор с высоким

коэффициентом экстинкции и получено несколько вариантов FRET-сенсора. Интересным результатом является также кристаллизация донора в живых клетках, которая открывает интересные перспективы для исследования структур GFP-подобных белков и FRET-сенсоров.

Структура диссертации

Структура диссертационного исследования построена по традиционной схеме и начинается с введения, с описанием актуальности и значимости работы, затем идут 3 основные главы: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение». Завершается работа заключением, содержащим основные выводы о проделанной работе. Работа представлена на 135 страницах, содержит 46 рисунков и 20 таблиц.

Изложение литературных данных и результатов исследования хорошо структурировано, подразделы отражают порядок проведения исследования и логически связаны друг с другом.

В работе поставлены 6 основных задач, по которым сформулированы 5 положений, выносимых на защиту, полностью отражающих задачи. По результатам диссертационной работы сформулированы 7 выводов, соответствующих сформулированным целям и задачам. Выносимые положения подтверждаются результатами работы и являются научно обоснованными и практически значимыми. Диссертация представляет собой законченную работу, автореферат диссертационной работы и опубликованные автором научные труды в достаточной мере отражают содержание диссертации.

Содержание диссертации

Во Введении автор обозначает актуальность темы исследования, формулирует цели и задачи, характеризует научную новизну, теоретическое и практическое значение результатов, приводит список положений, выносимых на защиту. Указывается личный вклад автора в работу и приводятся сведения об апробации работы на международных и всероссийских конференциях. Также указывается количество публикаций в рецензируемых журналах.

В главе 1 «Обзор литературы» автор концентрируется на фотопревращающихся белках, описывая типы и механизмы фотопревращений, большое внимание уделено зелёно-красной фотоконверсии белков и выходу этой реакции. Также описано влияние аминокислотных остатков цистеина на фолдинг белка в окислительных условиях и уже имеющийся опыт по их мутагензу. Описано влияние мутагенеза на созревание белков при температуре тела млекопитающих. Поскольку сенсор направлен на исследование апоптотических протеаз, подробно рассмотрены пути и механизмы апоптоза. Довольно кратко описаны хромопротеины.

Обзор литературы отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы, написан логично и хорошо иллюстрирован.

В главе 2 «Материалы и методы» автором перечислены основные реактивы, использованные в работе, дано подробное описание методик исследования. В частности, не только описан, но и проиллюстрирован метод Overlapped PCR. Подробны и обширны методы выделения и очистки белков. После очистки Марынич Н.К. подробно охарактеризована каждая мутантная форма, как спектроскопически, так и кинетически, получены в том числе значения времен жизни флуоресценции отдельных белков. Даже эффективность гидролиза сенсора проанализирована как по изменению интенсивности, так и по изменению времени жизни донора. Видно широкое владение биохимическими методами и тщательный подход к анализу результатов.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» описываются полученные автором результаты, разделённые на 7 подглав. Первая часть этого раздела посвящена подбору хромопротеина в качестве акцептора во FRET-паре. Из имеющихся вариантов выбран мономерный Ultramarine, характеризующийся высоким коэффициентом молярной

экстинкции и высоким значением интеграла перекрытия с донором – красным флуоресцентным белком TagRFP.

Вторая и несколько последующих частей посвящены мутагенезу донора - белка SAASoti. Во второй части получен moxSAASoti – вариант, полностью лишенный аминокислотных остатков цистеина, что делает его пригодным для работы в окислительных условиях клетки.

С третьей части автор проводил дальнейший мутагенез moxSAASoti с внесением замен для улучшения зелено-красной фотоконверсии белка, в четвертой для улучшения созревания, а в пятой - работу по объединению этих замен с целью аддитивного добавления свойств.

В шестой части проводились работы по конструированию сенсора на активность каспазы-3 с FRET-парой newmoxSAASoti-хромопротеин. И хотя пока работы по характеристике сенсора проведены только *in vitro*, результаты выглядят многообещающе.

Наиболее интересны результаты заключительной части, в которой получены *in cellulo* и *in vitro* кристаллы moxSAASoti^{F97M}. Существует несколько десятков кристаллических структур GFP-подобных белков, однако на живых клетках получена только одна. Добавление данных по кристаллизации таких белков в живых клетках потенциально открывает новое направление для изучения их структуры и свойств.

В Заключении автором обобщены полученные данные и выделены основные результаты.

Выводы соответствуют поставленным задачам, согласуются с приведенными экспериментальными данными.

Представленные в диссертации экспериментальные результаты получены с применением современных методов и свидетельствуют о том, что поставленные задачи были успешно решены. Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов соответствует полученному объему экспериментального материала, что подтверждается использованием современных биохимических, физико-химических и структурных методов.

Научная новизна

Проведенная исследовательская работа соответствует современному состоянию науки в данной области и обладает неоспоримой новизной. В ней впервые получена «мох» форма уникального бифотохромного белка SAASoti. Было получено и детально охарактеризовано несколько мутантных форм moxSAASoti с различными свойствами. Получено и охарактеризовано несколько FRET-сенсоров. Открыта способность белка moxSAASoti F97M к кристаллизации в живых клетках. Отдельного внимания заслуживает получение структуры с высоким разрешением и детальный анализ кристаллических контактов.

Научно - практическая значимость

С практической точки зрения, данные, полученные в работе Марынич Н.К., позволяют по-новому взглянуть на рациональное управление свойствами флуоресцентных белков путем мутагенеза. Также потенциально такой сенсор можно использовать в скрининг системах различных лекарственных препаратов.

Апробация результатов

Основные результаты работы отражены в публикациях, включающих 4 статьи в международных рецензируемых журналах. Степень достоверности результатов обусловлена применением современных биохимических методов. Результаты диссертации доложены на 7 международных и всероссийских конференциях. Всё это свидетельствует о хорошем качестве работы и независимой высокой оценке специалистами её результатов.

Замечания и вопросы по работе

По работе следует сделать ряд замечаний, которые не носят принципиальный характер и влияют на положительную оценку диссертации в целом.

1. Измерение кинетики образования и гибели красной формы после фотооблучения при 400 нм в растворах флуоресцентных белков было выполнено при детектировании флуоресценции красной формы (569 нм). При обсчете кинетики использовано решение дифференциального уравнения для последовательной реакции с одним промежуточным продуктом, которое описывается с помощью 2-х констант k_1 и k_2 (уравнение 11, стр 81). Однако, красная форма образуется из фотовозбужденного синглетного состояния с временем жизни около 2 нсек, что соответствует константе $k_1=5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Эксперимент автора предполагает стационарное фотовозбуждение при 400 нм и псевдовидимость кинетики (20 сек) накопления с красной формы в экспериментах автора возникает в результате чрезвычайно большого времени жизни красной формы (около 100 сек), что и соответствует, измеренной автором константы $k_2=1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. На самом деле накопление красной формы происходит не за 100 сек, а в 10^{10} раз быстрее - за 2 нсек.

Таким образом, в эксперименте автора k_1 - это аппаратная функция и константа k_1 физического смысла не имеет, эти константы можно не измерять и исключить из Табл 11, стр. 82, и не обсуждать в работе.

2. Автор дает в таблице высокую точность определения экспериментальных констант k_2 . Для используемой в диссертации приборной базы эта точность на самом деле в 10 раз хуже и составляет обычно для кинетических экспериментов такого рода в лучшем случае 10% (одна из причин – отсутствие термостатирования кюветы с образцами при измерениях). В работе не указана температура, при которой проводили эксперименты, вероятно это была комнатная температура (в интервале 20 – 24 С). С учетом большого времени жизни красной формы, эта реакция гибели красной формы имеет значительную энергию активации и в эксперименте следовало бы вести контроль температуры, так как без контроля температуры ошибка в определении константы изомеризации красной формы k_2 драматически возрастает.

3. Расчет этих константы k_2 для наглядности следовало бы представить в виде зависимости $\lg I-t$ для доказательства мономолекулярного характера механизма гибели красной формы. При этом изменение в интенсивности флуоресценции должно быть минимум на порядок для большей точности k_2 , измерения в эксперименте следовало бы проводить с накоплением сигнала из нескольких измерений.

4. В диссертации следовало бы привести полный расчет Фёрстеровского радиуса для системы изучаемой автором диссертации. Но в работе только приводятся общие принципы расчета Фёрстеровского радиуса из литературы, и делается предположение о приблизительной оценка фактора $k^2 = 2/3$, который характеризует зависимость FRET от угла между двумя хромофорами и может быть в интервале 0 – 4. С учетом исследованного строения флуоресцентного белка можно было попытаться оценить k^2 более точно.

Заключение

Диссертация Марынич Надежды Константиновны «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» представляет собой целостное и законченное научное исследование, выполненное на высоком методологическом уровне.

По объему выполненного исследования, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа Марынич Надежды Константиновны «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» полностью 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.

Диссертационная работа Марынич Н.К. «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, заслушана, обсуждена, одобрена и утверждена на объединенном научной семинаре Лаборатории процессов фотосенсибилизации и профильных лабораторий Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук и 21 января 2025 г. (протокол №1)

Отзыв на диссертационную работу Марынич Н.К. подготовлен заведующим лабораторией процессов фотосенсибилизации Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН Кузьминым Владимиром Александровичем.

Заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Профессор, Доктор химических наук
По специальности 02.00.04 – Физическая химия
Адрес 119334, Москва, ул. Косыгина д.4
Телефон: +7(495)939-73-41
e-mail: vladimirkyzmin7@gmail.com



Кузьмин В.А.

Я, Кузьмин Владимир Александрович, настоящим даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в аттестационные дела соискателя и дальнейшую обработку.

Кузьмин В.А.

Подпись зав. лаб. д.х.н. Кузьмина В. А. заверяю.

Ученый секретарь ИБХФ РАН к.б.н.

21 января 2025 г.



С.И. Скалацкая.