



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

15.02.2024
На №

№ 85-07-19/835
от

«УТВЕРЖДАЮ»

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 Гавшиной Александры Васильевны «Направленное воздействие на физико-химические и флуоресцентные свойства бифотохромного флуоресцентного белка mSAASoti» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненную в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н.Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

В 2015 году Гавшина Александра Васильевна окончила кафедру химии природных соединений Химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия». С 2017 г. и по настоящее время Александра Васильевна работает в лаборатории физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук в должности младшего научного сотрудника. В 2015 году Александра Васильевна поступила в очную аспирантуру Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, а в 2017 году – перевелась на второй курс очной аспирантуры ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. В июле 2020 г. Гавшиной А.В. присвоена квалификация «Исследователь. Преподаватель-исследователь» (диплом об окончании аспирантуры 107705 0007389). 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 «Направленное воздействие на физико-химические и флуоресцентные свойства флуоресцентного белка mSAASoti» принято следующее заключение:

Актуальность работы

Открытие и расшифровка гена зеленого флуоресцентного белка GFP стали отправной точкой в новом витке исследований живого мира. Флуоресцентная метка белковой природы, требующая для созревания лишь присутствие кислорода, выгодно отличалась на фоне синтетических флуоресцентных красителей возможностью генетического кодирования для прижизненного наблюдения на разных стадиях клеточного цикла. Богатая фотохимия и физико-химические свойства после тщательного исследования их «непредсказуемого» поведения превратились в мощные инструменты мониторинга химического состава и физико-химических параметров клеток и организмов. Кроме того, эти свойства легли в основу сверхразрешающих методов флуоресцентной микроскопии, позволивших в 10 раз превзойти дифракционный предел, описанный Э.К. Аббе в XIX веке, а открытие фотопереключаемых флуоресцентных белков позволило расширить число решаемых задач. Флуоресцентные белки внесли большой вклад в развитие науки, что и стало основанием для присуждения сразу двух Нобелевских премий по химии: 2008 год – «За открытие и развитие зелёного флуоресцентного белка» и 2014 год – «За создание флуоресцентной микроскопии высокого разрешения».

В настоящее время известно больше 100 организмов, содержащих флуоресцентные белки, а также получены сотни вариантов мутантных форм флуоресцентных белков. Новые гены флуоресцентных белков часто обладают флуоресцентными и физико-химическими свойствами, которые были неизвестны ранее для флуоресцентных белков и синтетических красителей. Например, большой интерес вызвали фотосенсибилизатор KillerRed, гидратация хромофора Dreiklang под воздействием света и пр.

Объектом исследования является фотоконвертируемый и фотопереключаемый флуоресцентный белок SAASoti и его мутантные формы. Фотоконвертируемый флуоресцентный белок SAASoti был впервые выделен сотрудниками лаборатории физической биохимии (Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН) из коралла *Stylocoeniella armata*, обнаруженного в лагуне острова Оти (Большой Барьерный риф). Впоследствии была получена его мономерная форма (V127T SAASoti или mSAASoti) и продемонстрирована возможность применения mSAASoti в методах супер-разрешающей микроскопии (фотоактивационной локализационной микроскопии), а также было обнаружено свойство обратимого фотопереключения.

Целью данной работы являлось изучение возможности получения вариантов mSAASoti с заданными свойствами (повышенная скорость переключения зеленой и красной форм,

истинно мономерная форма) путем рационального мутагенеза.

Для достижения этих целей были сформулированы следующие **Задачи**:

- 1) Выявить функционально важные остатки цистеина при анализе мутантных форм mSAASoti, содержащих замены остатков C21, C71, C105, C117 и C175.
- 2) Получить и охарактеризовать мутантные формы mSAASoti, содержащие замены аминокислотных остатков в микроокружении хромофора (M163, F177).
- 3) Проанализировать влияние замены K145P на свойства белка mSAASoti.
- 4) Установить структурные основы для эффективного фотопереключения.
- 5) Получить форму белка mSAASoti, пригодную для кристаллизации с последующим получением кристаллической структуры.

Научная новизна

Ранее бифотохромные белки получали путем введения замен а.о. в микроокружении хромофора (V157, F173 или M159), при этом амплитуда фотопереключения из флуоресцирующего в темное состояние превосходила необратимую фотодеструкцию. Однако, в случае mSAASoti свойство обратимого фотопереключения присутствует только для зеленой формы хромофора, в то время как красная форма подвергается лишь необратимой фотодеструкции при облучении зеленым светом, что может ограничивать его использование в методе RESOLFT, например. Для флуоресцентного белка mSAASoti эти свойства наблюдаются с сохранением соответствующих аминокислотных остатков, что делает его уникальным представителем семейства фотопереключаемых белков, а механизм фотопереключения, предложенный ранее при исследовании гомологичных флуоресцентных белков, может отличаться в случае SAASoti. В ходе данной работы впервые были получены быстропереключаемые формы mSAASoti, способные к необратимой фотоконверсии из зеленого в красный, а также к обратимому переключению из флуоресцентного в темное состояние для обеих форм. Получены и впервые охарактеризованы мутантные формы SAASoti, содержащие замены аминокислотных остатков цистеина. Для формы C21N mSAASoti впервые получена кристаллическая структура с разрешением 3,0 Å. Методом динамического сетевого анализа на различных мутантных формах mSAASoti было установлено, что для эффективного фотопереключения необходимо, чтобы движения остатка гистидина из хромофор-образующей триады и фенильного фрагмента хромофора коррелировали и принадлежали одному сообществу.

Теоретическая и практическая значимость

Флуоресцентная метка, способная к различным видам фототрансформации и обладающая повышенной скоростью и эффективностью фотопереключения, имеет ряд преимуществ. Во-первых, при использовании такой метки требуются меньшие дозы и время экспозиции облучающего света, а во-вторых, она одновременно может быть использована в различных вариациях супер-разрешающей микроскопии. Однако, ее применение может быть ограничено в живых клетках и организмах из-за возможного взаимодействия между меткой и компонентами системы, поэтому выявление

реакционноспособных а.о. флуоресцентного белка является важной задачей как с теоретической, так и с практической точек зрения.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Данные, представленные в данной работе, были получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах исследований: планирование, проведение эксперимента, сбор и обработка данных, оформление результатов и подготовка к публикации. Молекулярно-динамические расчеты и динамический сетевой анализ вариантов mSAASoti были проведены при непосредственном участии д.ф.-м.н. Хреновой М.Г. (группа молекулярного моделирования ФИЦ Биотехнологии РАН). Кристаллическая структура была получена совместно с к.б.н. Бойко К.М. (лаборатория инженерной энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН).

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Представленные в работе данные были получены при использовании современных физико-химических методов и с применением статистической оценки погрешности результатов. По теме научной работы было опубликовано четыре статьи в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были также представлены в виде стендовых и устных докладов на всероссийских и международных конференциях: 3-d School on ADFLIM (Саратов, Сентябрь 2018 г.), Topical Problems of Biophotonics (Нижний Новгород, Июль 2019 г.), Отчетная конференция аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва, Июнь 2018, 2019 и 2020 гг.).

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.

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

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, и 5 тезисов, опубликованных в материалах конференций, которые приведены ниже.

Список публикаций

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science :

- 1) Gavshina A.V., Marynich N.K., Khrenova M.G., Solovyev I.D., Savitsky A.P. The role of cysteine residues in the allosteric modulation of the chromophore phototransformations of biphotochromic fluorescent protein SAASoti. // *Scientific Reports* – 2021. – Vol. 11. – 24314. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03634-9>.
- 2) Gavshina A.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P. The role of the 145 residue in photochemical properties of the biphotochromic protein mSAASoti: brightness versus

photoconversion. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022. – Vol. 23. – 16058. <https://doi.org/10.3390/ijms232416058>.

- 3) Gavshina A.V., Solovyev I.D., Khrenova M.G., Boyko K.M., Varfolomeeva L.A., Minaev M.E., Popov V.O. The role of the correlated motion(s) of the chromophore in photoswitching of green and red forms of the photoconvertible fluorescent protein mSAASoti. // *Scientific Reports* – 2024. – Vol. 14. – 8754. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59364-1>.

Тезисы докладов:

- 1) Гавшина А.В., Савицкий А.П. Подбор условий для выделения препаративных количеств рекомбинантного флуоресцентного белка V127T SAASoti для последующего получения кристаллической структуры // *Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 25-28 июня 2018 г., Москва.*
- 2) Gavshina A.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P. Oligomerization state of V127T SAASoti fluorescent protein at high concentrations // *3-d School on ADFLIM, 24-28 сентября 2018 г., Саратов.*
- 3) Гавшина А.В., Савицкий А.П. Получение и характеристика форм флуоресцентного белка SAASoti с повышенной скоростью фотопереключения // *Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 24-28 июня 2019 г., Москва.*
- 4) Gavshina A.V., Marynich N.K., Savitsky A.P. The role of surface cysteine residues of SAASoti-FP // *Topical problems of biophotonics.* 27-31 июля 2019 г., Нижний Новгород.
- 5) Гавшина А.В., Савицкий А.П. Поиск перспективных форм флуоресцентного белка SAASoti после введения случайных аминокислотных остатков по определенным положениям // *Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, 22-30 июня 2020 г., Москва.*

Рекомендуемые оппоненты:

Кузьмин Владимир Александрович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации Института Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН.

Субач Федор Васильевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярного конструирования Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Рекомендуемая ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

На основании проведенного семинара диссертация «Направленное воздействие на физико-химические и флуоресцентные свойства бифотохромного флуоресцентного белка mSAASoti» Гавшиной Александры Васильевны 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 №1 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

