

ОТЗЫВ

официального оппонента Кузьмина Владимира Александровича на диссертационную работу Гавшиной Александры Васильевны на тему «Направленное воздействие на физико-химические и флуоресцентные свойства бифотохромного флуоресцентного белка mSAASoti», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Актуальность темы

В диссертационной работе Гавшиной А.В. проводилось изучение бифотохромного флуоресцентного белка mSAASoti и его мутантных форм, обладающих улучшенными флуоресцентными параметрами. Подобные белки ранее получали генно-инженерными методами из фотоконвертируемых, однако зеленая форма mSAASoti является уже бифотохромной, что делает изучение ее свойств интересным с фундаментальной точки зрения. Также фототрансформируемые белки являются неотъемлемым инструментом для проведения супер-разрешающих методов микроскопии при исследовании живых систем как в локализационных методах, так и при изучении процессов в динамике, поэтому получение быстропереключаемой бифотохромной (как в зеленом, так и в красном канале) метки является интересной задачей с практической точек зрения.

Цель исследования и задачи

Цели и задачи сформулированы корректно и охватывают комплексное исследование белка mSAASoti и его мутантных форм по различным флуоресцентным параметрам. Стоит отметить, что в рамках поставленных задач, автор в конце стремится найти объяснение явлению фотопереключения внутри семейства белка mSAASoti.

Научная новизна

Исследовательская работа Гавшиной А.В. соответствует текущим интересам в области фототрансформируемых флуоресцентных белков и обладает явной новизной. В ней впервые были получены формы mSAASoti, способные к фотопереключению красной формы, также впервые была получена кристаллическая структура. Впервые методом динамического сетевого анализа было показано, что эффективное фотопереключение происходит, если имеется корреляция в движениях фрагментов хромофора и они принадлежат к одному сообществу.

Научно-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.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа была выполнена с применением ряда разнообразных современных методов, что свидетельствует о высокой степени достоверности полученных результатов. По теме научной работы было опубликовано 3 статьи в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были также представлены в виде стендовых и устных докладов на всероссийских и международных конференциях, что свидетельствует о хорошем качестве работы и независимой высокой оценке специалистами ее результатов в данной области.

Характеристика разделов работы

Работа представлена на 137 страницах, содержит 43 рисунка и 15 таблиц. Диссертация построена стандартным образом. Работа начинается с Введения, описания

актуальности и значимости работы с предоставлением основных положений, выносимых на защиту, затем идут 3 основные главы: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение». Завершается работа Заключением, содержащим основные выводы о проделанной работе.

В Главе 1 «Обзор литературы» автор дает общее представление о флуоресцентных белках, описывает механизмы фототрансформации. Также приведена информация о практическом применении гомологичных белков на практике в супер-разрешающей микроскопии. Описано получение белков, не содержащих остатки цистеина.

В Главе 2 «Материалы и методы» автором дана характеристика всех методов исследования и материалов, используемых в работе. Для реакций фотоконверсии и фотопереключения приведены уравнения, которые описывают кинетические схемы соответствующих фотопревращений. Можно отметить разнообразие методов характеристики флуоресцентных белков – в растворе, при экспрессии в клетках *E.coli* и клетках *HeLa Kyoto*.

В Главе 3 «Результаты и их обсуждение» описаны полученные автором результаты. Первая часть этого раздела посвящена подбору оптимальных условий для выделения и очистки белка mSAASoti и его мутантных форм после экспрессии в клетках *E. coli*. Затем описано получение форм mSAASoti, содержащих замены остатков цистеина. Среди полученных вариантов был выбран белок C21N mSAASoti для получения кристаллической структуры mSAASoti. В третьей части описано получение быстропереключаемых форм mSAASoti с применением сайт-насыщенного мутагенеза и флуоресцентного скрининга колоний. Для выбранных быстропереключаемых форм было также показано применение в микроскопии в эукариотических клетках и измерены кинетические параметры фотопереключения *in vivo*. Для объяснения изменения флуоресцентных характеристик после введения замен а.о. в некоторых случаях проводилось молекулярно-динамическое моделирование, которое позволило установить структурные причины наблюдаемых явлений. В заключительной части описано получение кристаллов и установление кристаллической структуры белка C21N mSAASoti.

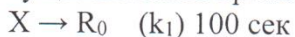
В Заключении Гавшиной А.В. были обобщены полученные данные и выделены основные результаты. Выводы соответствуют поставленным задачам, хорошо соотносятся с приведенными экспериментальными данными и дополняют общие знания о физико-химических свойствах бифотохромных флуоресцентных белков.

В тексте автореферата содержатся основные результаты и выводы диссертационной работы, в нем отражен вклад автора, а также степень новизны, теоретическая и практическая значимость результатов.

Несмотря на то, что работа хорошо иллюстрирована, в ней имеется недостаточно полное описание условий проведенных экспериментов, что, однако, не препятствует восприятию текста диссертации.

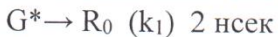
1. Нет ясного описания условий облучения растворов флуоресцентных белков (стационарное или импульсное облучение). Нет обоснования, чем обусловлено время для облучения 10 мин при освещении светом $\lambda=400$ нм (146 МВт/см²).
2. В диссертации и в автореферате нет схемы элементарных фотохимических и темновых процессов, которые происходят после фотооблучения растворов флуоресцентных белков. Каким элементарным процессам относятся определяемые константы k_1 и k_2 ? Расчет этих констант для наглядности следовало бы представить в виде зависимости $\lg I-t$.
3. Следует заметить, что это не двухэкспоненциальная кинетика, а кинетика образования и гибели промежуточного продукта, полученного как результат решения дифференциального уравнения кинетической схемы последовательного превращения с участием промежуточного продукта X. Согласно уравнению 3 стр. 72 и тексту диссертации автора «Кинетика образования красной формы описывается биэкспоненциальной моделью (Уравнение 3), где первая компонента отвечает за образование красной формы, а вторая – за ее фотодеструкцию». Следовательно, автор

утверждает, что имеет место следующий механизм превращений, который включает существование промежуточного продукта X с временем жизни 100 сек (k_1).



На самом деле после фотовозбуждения и поглощения фотона 400 нм мутантными зелеными формами флуоресцентных белков SAASoti образуется фотовозбужденное синглетного состояние $G_0 + h\nu \rightarrow G^*$ (время жизни флуоресценции 2 нсек), из которого с константой k_1 образуется красная форма и с константой k_2 красная форма гибнет.

В действительности кинетическая схема выглядит следующим образом



Измерение кинетики образования и гибели красной формы при фотооблучения 400 нм в растворах белков было выполнено автором при детектировании флуоресценции красной формы. Однако, при фотооблучении зеленой формы красная форма образуется из фотовозбужденного синглетного состояния, которое имеет время жизни примерно 2 нсек, и это соответствует константе $k_1 = 5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. В эксперименте автор использует стационарное фотовозбуждение при 400 нм и экспериментально регистрирует накопление красной формы за время около 100 сек (что соответствует, полученной автором константе $k_1 = 1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). Это обусловлено чрезвычайно большим временем жизни красной формы (500 сек), которая при стационарном фотовозбуждении успевает накопиться в концентрациях достаточных для регистрации её по спектру флуоресценции. Следовательно, в экспериментах автора диссертации $k_1 = 1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ - это аппаратная функция и кажущееся время накопление красной формы 100 сек – это результат ее долгого времени жизни. На самом деле время накопления красной формы в 10^{10} раз быстрее (десять миллиардов раз). Полученная автором работы константа k_1 физического смысла не имеет, эти константы можно было не измерять и исключить из Табл. 11, стр. 78, и не обсуждать в работе.

4. Автором приводится чрезвычайно высокая точность определения экспериментальных констант k_1 и k_2 , что не соответствует используемой в диссертации приборной базы. Эта точность в 10 раз хуже и составляет 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 и по умолчанию следует предположить комнатную температуру в интервале 20 – 24⁰ С. Большое время жизни красной формы свидетельствует о высокой энергии активации реакции изомеризации и сильной зависимости константы k_2 от температуры, что в свою очередь должно увеличить ошибки в измерении констант k_2 .

5. Величина спектрального сдвига для всех образцов mSAASoti, не содержащих замену S175A, после облучения светом 470 нм (Таблица 10, Стр. 73) составляют 1 -3 нм, что вызывает сомнение в целесообразности обсуждения этих значений с учетом довольно большой полуширины спектров поглощения 25 -30 нм.

6. Обсуждение результатов флуоресцентных измерений кинетики носит качественный и вероятностный характер. Нет однозначной корреляции константы k_2 с результатами исследования строения модифицированных автором флуоресцентных белков.

При этом следует отметить, что автором проведена чрезвычайно большая по трудоемкости работа по синтезу, выделению и по очистке мутантных форм фотоконвертируемых и фотопереключаемых флуоресцентных белков SAASoti, проведено большое исследование по молекулярно-динамическому моделированию с потенциалами КМ/ММ красных форм различных вариантов белков. Кроме того, автором получена кристаллическая структуры мутантной формы mSAASoti для последующих структурных исследований.

Эти замечания имеют частный характер и не влияют на оценку работы в целом.

Заключение

Диссертационная работа Гавшиной Александры Васильевны «Направленное воздействие на физико-химические и флуоресцентные свойства бифотохромного флуоресцентного белка mSAASoti», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842, а ее автор заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук (02.00.04 – Физическая химия), профессор, заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Кузьмин Владимир Александрович

119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

Телефон: +7 (495) 939 73-41

e-mail: vladimirkuzmin7@gmail.com

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 аттестационное дело соискателя и дальнейшую обработку.

Кузьмин Владимир Александрович

«Подпись д.х.н. Владимира Александровича Кузьмина заверяю»

Ученый секретарь ИБХФ РАН, к.б.н.

Светлана Ивановна Скалацкая

Дата 21 января 2025 г.

