

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Гавшиной Александры Васильевны
на тему: «НАПРАВЛЕННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИЕ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА
БИФОТОХРОМНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА mSAASoti»
по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность избранной темы

В семейство EosFP фотоконвертируемых зелено-красных флуоресцентных белков входят несколько представителей, таких как EosFP, Dendra, IrisFP, включая белок mSAASoti, являющийся объектом исследования в данной работе. Главной особенностью белков семейства EosFP является необратимая фотоконверсия из зеленого состояния в красное при облучении светом 405 нм. Эти белки нашли основное применение в микроскопии сверхвысокого разрешения. Однако понимание механизмов функционирования белков семейства EosFP, а также улучшение их ключевых характеристик затруднено из-за сложности процесса фотоконверсии и ограниченного числа подобных белков. Таким образом, диссертационная работа Гавшиной А.В. вносит существенный вклад в изучение механизма функционирования белков семейства EosFP, и разработку подходов для оптимизации ключевых параметров этих белков.

Научная новизна исследования. В работе впервые изучена роль остатков цистеина на основные параметры белка mSAASoti. Впервые получена структура белка mSAASoti. Впервые получены мутантные формы белка SAASoti с измененными характеристиками, такими как константа кислотности хромофора, скорость релаксации и фотопереключения и коэффициент поглощения. Впервые с помощью методов молекулярной

динамики предложены модели уширения спектров мутантов mSAASoti и корреляционная модель фотопереключения.

Структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Работа изложена на 137 страницах, включая страницы со списком цитированной литературы. Также она включает 45 рисунков и 18 таблиц. Диссертация содержит следующие стандартные разделы: «Оглавление», «Список использованных сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследований», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Публикации по теме работы» и «Приложение».

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности проблемы, сформулированы цели и задачи работы, обозначены объект и предмет исследования, научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость работы, методология диссертационного исследования, личный вклад автора, положения, выносимые на защиту, апробация работы, публикации и структура и объем диссертации.

«Обзор литературы» включает данные о современном состоянии исследований в области изучения и разработки флуоресцентных белков. Даются представления о процессах фотопереключения, фотоактивации, фотоконверсии и фотодеструкции. Описаны различные варианты применения фотоактивируемых и фотоконвертируемых белков, включая микроскопию сверхвысокого разрешения. Описаны бесцистеиновые флуоресцентные белки. Даются представления о механизмах фотопереключения. Описан объект исследования белок SAASoti.

В целом, «Обзор литературы» написан ясно, хорошим научным языком, широко охватывает материал и дает полное представление о проблемах и задачах в данной области исследования.

Глава «Материалы и методы» подробно описывает стандартные процедуры, использованные при проведении исследований. Автор демонстрирует использование большого арсенала современных методов молекулярной и клеточной биологии, таких как: стандартное молекулярное клонирование белков и их выделение и очистка с помощью различных вариантов хроматографии из бактериальных культур, трансфекция животных клеток, скрининг кристаллов. Кроме того, стоит отметить использование автором флуоресцентного микроскопа для скрининга фотоконвертируемых колоний и установки для облучения растворов белков. Методический уровень диссертации, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из 7-ми частей и содержит основные результаты работы. На первом этапе работы были проведены клонирование и оптимизация условий для выделения и очистки флуоресцентного белка mSAASoti.

На следующем этапе работы проведено изучение роли остатков цистеина, находящихся на поверхности и внутри бочонка белка, в процессе фототрансформаций mSAASoti.

Затем был получен мутант белка mSAASoti для последующей кристаллизации. Проведен анализ структуры белка SAASoti.

Далее было проведено изучение влияния остатков цистеина на увеличение rK_a хромофора и скорость релаксации зеленой формы с помощью молекулярного моделирования.

На последующих двух этапах работы были получены варианты mSAASoti с улучшенным коэффициентом поглощения и с повышенной скоростью фотопереключения. Свойства лучших версий были охарактеризованы в животных клетках.

И, наконец, на последнем этапе работы Гавшина А.В. с помощью молекулярного моделирования выявила взаимосвязь между фотопереключением и коррелированным движением групп аминокислотных остатков.

Текст сопровождается 153-ю ссылками, большая часть которых относится к работам последних двух десятилетий, в том числе 2020 года.

Диссертационная работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». Все научные положения, выносимые на защиту, заключения и научные выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации достоверны, обоснованы, новы и полностью отражают полученные научные результаты.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертационная работа отражена в трех научных статьях, опубликованных автором в зарубежных журналах IJMS (MDPI) и Sci. Rep. Результаты исследования доложены на пяти конференциях.

В целом, работа выполнена на самом высоком научном уровне, существенных замечаний к представленной работе нет:

Отмечу, что в диссертации хотя и присутствуют опечатки и орфографические ошибки, но они не относятся к научной сути работы.

Замечание к работе:

- 1) В литобзоре отсутствует описание методов BALM и PAINT.
- 2) В работе отсутствует сравнение ключевых свойств белка mSAASoti, таких как яркость, контраст и скорости фотоконверсии и фотопереключения, с белками аналогичного типа, например, IrisFP.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным требованиям

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа Гавшиной Александры Васильевны на тему: «Направленное воздействие на физико-химические и флуоресцентные свойства бифотохромного флуоресцентного белка mSAASoti» отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013

года №842. Таким образом, соискатель Гавшина Александра Васильевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

кандидат химических наук,
старший научный сотрудник лаборатории молекулярного конструирования
Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный
исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский
институт»)

Субач Федор Васильевич

/Ф.В. Субач/

03 февраля 2025 г.

Контактные данные:

Тел.: +7 (968)9627083, e-mail: subach_fv@nrcki.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.10 – биоорганическая химия

Адрес места работы:

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

Тел.: +7 (968)9627083, e-mail: subach_fv@nrcki.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный
исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский
институт»), лаборатория молекулярного конструирования

Тел.: +7 (499)1967100-3389, e-mail: subach_fv@nrcki.ru

Подпись сотрудника Ф.В. Субача заверяю:

Первый Заместитель Главного Ученого секретаря

НИЦ "Курчатовский институт",

к. ф.-м. н.



Борисов К.Е.
03 февраля 2025