



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

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
(ГНЦ ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

05 ФЕВ 2025

№ 4.10-48-110

на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ГНЦ ИБХ РАН,
Д.х.н., академик РАН

Габитов А. Г.

28 января 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Гавшиной Александры Васильевны
«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.

Клонирование гена флуоресцентного белка GFP из морской медузы *Aequorea victoria* и экспериментальное подтверждение его способности к автокаталитическому созреванию при гетерологичной экспрессии стало отправной точкой для развития широкого арсенала аналитических методов в биохимии и клеточной биологии. Данная метка обладает уникальным преимуществом, позволяющим осуществлять неинвазивную и прижизненную визуализацию сигналов в тканях без предшествующего введения красителя, которое порой бывает затруднено и приводит к возникновению целого ряда артефактов измерения. За последние тридцать лет научное сообщество приложило многочисленные усилия по обнаружению гомологов GFP в других организмах, получению палитры «цветных» вариантов и оптимизации их фотохимических и фотофизических свойств. На текущий момент флуоресцентные белки прочно заняли свое место во множестве аналитических методов: создание генетически кодируемых сенсоров, мечение индивидуальных белков, органелл и клеток, регистрация промоторной активности, широкопольная, конфокальная микроскопия, а также микроскопия сверхвысокого разрешения. Невозможно переоценить то, какой вклад данная ветвь науки внесла в наше понимание молекулярных основ функционирования живых организмов.

Интересным и крайне перспективным направлением является получение и изучение свойств белков, способных к фотопревращениям. При этом особое внимание заслуживают бифотохромные белки, которые демонстрируют не только переключение между «темными» и

«светящимися» состояниями, но и претерпевают спектральный переход при определенном воздействии. Область их практического применения крайне широка. Так, они позволяют исследовать миграцию биомолекул, органелл и клеток, могут выступать эффективными акцепторами энергии в фотохромном FRET. Отдельно следует отметить их плодотворное использование в подходах микроскопии сверхвысокого разрешения (RESOLFT, PALM, SOFI и другие). На текущий день известно не так много белков, демонстрирующих подобный характер поведения (в качестве примеров стоит упомянуть IrisFP, NijiFP). Поэтому не возникает сомнений в том, что получение новых вариантов, а также изучение их свойств открывает широкие горизонты для новых исследований. Именно этому вопросу и посвящена кандидатская диссертация Гавшиной А. В.

Содержание диссертации.

Диссертация Гавшиной А. В. построена по традиционному плану и включает в свой состав следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследований, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы. Работа изложена на 137 страницах, содержит 43 рисунка и 15 таблиц, а также опирается на 153 литературных источника, среди которых присутствуют как оригинальные исследования, так и современные обзоры по теме.

Во «Введении» автор детально характеризует актуальность выбранной темы, описывает цели и задачи, которые были поставлены в рамках работы. Она также кратко обобщает теоретическую и практическую значимость полученных результатов, степень их обоснованности.

«Обзор литературы» начинается с описания строения и основных фотохимических свойств GFP и родственных белков. Автор рассматривает процесс автокаталитического созревания хромофора, а также главные фотохимические превращения, лежащие в основе спектральных свойств обсуждаемых молекул (в частности, процесс переноса протона в возбужденном состоянии). Несмотря на то, что данный раздел написан достаточно лаконично, он содержит необходимую информацию для погружения читателя в тему. Далее автор концентрируется на белках, демонстрирующих различные фотопревращения. Индивидуальные разделы посвящены фотопереключению, фотоактивации, фотоконверсии и фотодеструкции. При этом особое внимание уделено попытке систематизировать конкретные химические механизмы, лежащие в основе обсуждаемых процессов (роль объемных заместителей в конформационной мобильности хромофора, участие редокс-активных остатков в стабилизации конформеров, роль определенных групп в настройке рКа фенольной группы). Следующий раздел поднимает вопрос практического применения фотопревращаемых белков. При этом основной упор сделан на методы сверхвысокого разрешения. На наш взгляд автору стоило бы уделить больше внимания классификации этих подходов, а также тому, какие требования они выдвигают для используемых меток на практике и насколько современные белки им соответствуют. Кроме того, раздел мог бы быть расширен за счет обсуждения других аналитических направлений (фотохромный FRET и визуализация миграции единичных структур интереса). Далее автор кратко описывает получение бесцистеиновых флуоресцентных белков, а также их преимущества (возможность использования в окисляющих компартментах и минимизация нежелательных реакций, таких как агрегация). Небольшой фрагмент текста уделен компьютерному моделированию фотопревращений, однако он лишь систематизирует основные данные, которые были получены при помощи метода без обсуждения физико-математических принципов, лежащих в его основе. Наконец, «Обзор литературы» завершается описанием объекта исследования – природного бифотохромного белка SAASoti. В целом, данная глава написана хорошим научным языком, опирается на достоверные и современные источники, и, как результат, позволяет читателю понять теоретические основы работы.

Глава «Материалы и методы исследований» содержит необходимую информацию об экспериментальных процедурах, осуществленных в рамках работы. Представленные

протоколы описаны достаточно четко и могут быть воспроизведены сторонним читателем. Хочется отметить широкий арсенал подходов, задействованных в рамках диссертации. Среди них присутствуют методы молекулярного клонирования (в том числе точечный мутагенез), выделение и очистка рекомбинантных белков, оценка молекулярной массы белков методом гель-фильтрации, достаточно сложная флуоресцентная спектроскопия (индукция фотопревращений и оценка их кинетических параметров), кристаллизация белка и расшифровка его пространственной структуры, компьютерное моделирование динамики белка, а также работа с эукариотическими клетками (в том числе широкопольная микроскопия). Все это подчеркивает высокий методический уровень диссертации Гавшиной А. В.

Глава «Результаты и их обсуждение» начинается с разработки оптимального протокола для получения высоких концентраций очищенных препаратов SAASoti и его мутантных форм. Автором была предложена и экспериментально опробована комбинация гидрофобной хроматографии и ионообменной хроматографии, которая позволила достичь требуемого качества образцов. Большой раздел диссертации посвящен получению и исследованию физических и химических свойств бесцистеиновых мутантов SAASoti. В частности, при помощи гель-фильтрации автор показала участие C21 в агрегации мономеров белка в условиях высокой концентрации. Данный факт позволил получить вариант молекулы, более пригодный для кристаллизации, а также, в теории, более устойчивый к окисляющим условиям в клетке. Для остатка C71 была выявлена роль в регуляции скорости фотоконверсии из зеленой в красную форму, что, по мнению автора, связано с его близостью к хромофорной триаде в пространстве (стерические факторы или же реорганизация сети водородных связей). Проведенные эксперименты также установили, что C105 модулирует скорость фотопереключения из «светящегося» в «темное» состояние, а C175 определяет скорость термической релаксации. При этом спектроскопические и кинетические данные указывают на возможность фотоокисления последнего остатка, что и лежит в основе наблюдаемого феномена. Проведенное в рамках работы компьютерное моделирование белковой динамики позволило предположить, что замена C175A увеличивает жесткость белка, в частности – наблюдается меньшее количество конформаций для остатка F177. Таким образом, более высокая лабильность исходного варианта может объяснять большую скорость фоторелаксации. Для замены C21N молекулярное моделирование предполагает изменение полярности C-O связи в хромофоре, что, по всей видимости, лежит в основе наблюдаемого на практике сдвига pKa. Следует отметить, что подобный анализ стал возможен благодаря успешной кристаллизации белка и расшифровке его пространственной структуры. При этом, интересно, что ключевые аминокислотные остатки, участвующие в координации хромофоров mSAASoti и IrisFP, совпадают.

Большой раздел работы посвящен исследованию замен по позициям M163 и F177, играющих важнейшую роль в бифотохромном поведении других известных белков. Среди полученных мутантов автору удалось отобрать версии, которые демонстрируют фотопереключение в красной форме, что, до этого, не наблюдали в случае SAASoti. Кроме того, автору удалось получить варианты, для которых кинетика фотопереключения зеленой формы улучшена в 30 раз по сравнению с оригинальной молекулой. Наиболее интересные версии были экспрессированы в культуре клеток человека и показали удовлетворительные параметры контраста переключения и фотостабильности. При этом компьютерное моделирование позволило предположить молекулярные основы данных свойств. Интересно, что эффективное переключение для белков семейства SAASoti, по всей видимости, требует координации движения остатка б6Н и фенильного фрагмента хромофора.

Раздел «Закключение» подробно суммирует основные научные результаты, полученные в рамках работы. При этом автор не только описывает эмпирические наблюдения, но и размышляет о химической природе соответствующих процессов. Она также старается соотносить собственные данные с материалами, ранее опубликованными в литературе (в том числе на других белках семейства).

Раздел «Выводы» полностью соответствуют поставленным задачам.

Научная новизна, теоретические и практическое значение исследования.

В рамках работы при помощи мутационного анализа, спектроскопии и компьютерного моделирования получены ценные данные, проливающие свет на молекулярную природу фотопереключения и фотоконверсии SAASoti. Не вызывает сомнений, что в будущем они могут быть задействованы для направленной оптимизации свойств флуоресцентных меток (в том числе на основе других скэффолдов, например, IrisFP или NijiFP). При этом расшифровка пространственной структуры белка представляет отдельный интерес, поскольку она открывает широкий простор для моделирования фотохимических и фотофизических процессов, уже за пределами настоящей диссертации.

С практической точки зрения автору удалось впервые получить версию SAASoti, способную к эффективному фотопереключению в красной форме. Логичным продолжением этой работы будет валидация использования разработанных меток в режиме микроскопии сверхвысокого разрешения (например, в режиме run and chase). Учитывая тот факт, что современная коллекция бифотохромных белков достаточно скромная, оптимизированный SAASoti, несомненно, является ее ценным дополнением.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов.

Результаты, описанные в диссертационной работе, получены при помощи широкого арсенала актуальных методов биохимии, при этом в большинстве случаев автор приводит убедительные контроли.

Обсуждаемые данные представлены в 3 статьях, опубликованных в международных рецензируемых журналах. Среди них присутствуют такие известные издания как Scientific Reports. Автор также выступала на 5 тематических конференциях. Таким образом, научные положения и выводы, изложенные в тексте диссертации, являются обоснованными в достаточной мере и не вызывают сомнений.

Замечания.

1. Текст работы содержит достаточно большое количество опечаток.

2. В тексте присутствуют не совсем корректные жаргонизмы. Например, автор пишет: «новые гены флуоресцентных белков часто обладают флуоресцентными и физико-химическими свойствами» (речь про белки, а не про гены), «хромофор является «защищенным» от внешних воздействий и тушителей боковой цепью самого флуоресцентного белка» (речь про остов, а не боковую цепь) и так далее.

3. В обзоре литературы встречаются исторические неточности. Например, автор утверждает, что Шимомура и соавторы предположили резонансный перенос энергии между экворином и GFP в 1971 году, хотя они сделали это еще в исходной работе 61-ого года.

4. Несколько раз в обзоре литературы автор утверждает, что при созревании хромофора GFP сначала происходит дегидратация, а потом окисление, хотя в современных работах показано, что это не так.

5. В обзоре литературы автор утверждает, что протонированная форма GFP не флуоресцирует (за счет ESPT). Это не совсем верное упрощение, поскольку соответствующий пик может быть обнаружен при внимательном рассмотрении спектров (особенно при более низких температурах).

6. В обзоре литературы автор утверждает, что симбиоз корралов и водорослей является уникальным, поскольку в нем участвуют два эукариотических организма. Однако, известно множество примеров подобных симбиозов.

7. В обзоре литературы автор пишет: «Причиной потери способности флуоресцировать может служить изменение величины константы кислотности хромофора (pKa) в транс-форме и сопутствующее протонирование». Однако, протонирование хромофора само по себе не

обязательно снижает квантовый выход флуоресценции. Оно может приводить к изменению связей хромофора с микроокружением с сопутствующим нарушением планарности.

8. В обзоре литературы автор пишет, что у белка Padron нефлуоресцирующая форма представлена протонированным хромофором в транс-форме. В реальности хромофор в этих условиях депротонирован.

9. При обсуждении фотоактивации, автор утверждает, что у PAMTagRFP не происходит декарбоксилирования остатка глутамата. Однако, современные данные показывают, что это не так. Для PAMCherry также показано фотоиндуцированное окисление (не только декарбоксилирование). Для PAMKate показано декарбоксилирование.

10. При обсуждении фотодеструкции автор пишет: «Это предположение подтверждается значительным увеличением фотостабильности при замене остатка Y145 на менее сильные акцепторы электронов в eYFP [103], где хромофор взаимодействует как минимум с двумя остатками тирозина.» Однако в этой же статье показано, что второй остаток тирозина, напротив, играет протективную роль, выступая ловушкой электрона и не давая ему перейти на внешний окислитель.

11. На часть таблиц (№1, 2, 4) не присутствуют ссылки в тексте.

12. В материалах и методах указаны лишь названия праймеров в таблице, но не сказано, какие праймеры были использованы для какой задачи.

13. Автор пишет, что при гидрофобной хроматографии снижали концентрацию NaCl в элюирующем буфере. Вероятно, речь идет про сульфат аммония.

14. В материалах и методах отсутствует раздел, посвященный статистической обработке данных. Кроме того, в тех случаях, когда автор указывает ошибки измерений, она не уточняет идет ли речь про стандартные отклонения или же стандартные ошибки среднего.

15. Автор пишет: «Таким образом, MD-структуры с большей длиной связи имеют меньший отрицательный заряд на атоме кислорода и имеют меньшее сродство к протонированию; другими словами, они должны иметь более высокие значения pKa». Однако меньшее сродство к протону приводит к снижению pKa.

Вопросы.

1. При измерении эффективности созревания белков в культуре бактерий автор осуществляла нормировку на OD600. Почему не проводили нормировку на концентрацию белка? На рисунке 16 видно, что интенсивности полос на электрофореграммах не идентичны. Кроме того, следует отметить, что эффективность экспрессии и эффективность созревания – разные параметры.

2. В рамках работы концентрацию белка измеряли по коэффициенту поглощения при 280 нм, рассчитанному по первичной структуре. Однако, фолдинг белка может существенно влиять на параметры аминокислотных остатков, кроме того, сам хромофор способен поглощать в этой области. Почему не был использован какой-либо колориметрический метод?

3. Почему при определении квантового выхода и коэффициента поглощения автор не проводила поправку на концентрацию зрелых хромофоров? Ее можно оценить методом щелочной денатурации.

4. Почему за критерий чистоты белка было принято соотношение A509/A280 3:1? Убеждались ли форежом в отсутствии примесей?

5. Для кристаллизации был использован белок с C-концевым His-тагом. Поскольку автор утверждает, что His-таг может влиять на свойства белка (по этой причине для остальных экспериментов белки выделяли другим методом), встает вопрос, было ли осуществлено сравнение оптических свойств двух вариантов?

6. Какими соображениями руководствовались при математическом описании кинетических зависимостей? Проводили ли статистические тесты на предмет того, что экспериментальные данные соответствуют аппроксимации?

7. Автор утверждает, что версия K145P является более яркой. Однако в работе показано

лишь увеличение коэффициента поглощения хромофора (квантовый выход не измеряли). Не может ли в таком случае эта версия сильнее экспрессироваться или быстрее созреть, обладая схожей или даже меньшей яркостью?

8. В теории оптимизацию флуоресцентных белков можно осуществлять крайне долго, получая все более и более удачные варианты. Может ли автор оценить, насколько текущие версии пригодны для использования в современных протоколах (например, микроскопии сверхвысокого разрешения)? Есть ли у полученных версий преимущества по сравнению с другими бифотохромными белками (IrisFP, NijiFP)?

Заключение.


Работа Гавшиной А. В. «Направленное воздействие на физико-химические и флуоресцентные свойства бифотохромного флуоресцентного белка mSAASoti» представляет собой целостное и завершенное исследование, выполненное на высоком методологическом уровне. Работа отвечает всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в актуальной редакции), а ее автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности «биохимия» – 1.5.4.

Отзыв обсужден и утвержден на открытом семинаре отдела метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН (протокол №1 от 24.01.2025).

Кандидат биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология
младший научный сотрудник группы
метаболических основ патологии
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
ГНЦ ИБХ РАН

 Костюк Александр Игоревич

Кандидат биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология
старший научный сотрудник, рук. группы
метаболических основ патологии
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
ГНЦ ИБХ РАН

 Билан Дмитрий Сергеевич

Проведение научного семинара, подписи Билана Д.С. и Костюка А.И. удостоверяю

Доктор химических наук
Заместитель директора по науке ГНЦ ИБХ РАН

 Ямпольский Илья Викторович

