ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Соловьева Ильи Дмитриевича «Получение мономерной формы флуоресцентного белка SAASoti и применение его в методах субдифракционной и флуоресцентной корреляционной микроскопии», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Актуальность

Диссертационная работа Соловьева И.Д. посвящена актуальнейшей теме – созданию и применению новых молекулярных меток для микроскопии сверхвысокого разрешения. Актуальность данного направления подтверждается прежде всего постоянно растущим числом публикаций в мировой научной литературе, посвященных исследованию механизмов функционирования живых систем, реализующихся в нанометровой пространственной шкале, а также Нобелевской премией по химии в 2014 году за разработку субдифракционной микроскопии.

Среди разнообразных флуорофоров, применяющихся для флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, особое место занимают GFP-подобные флуоресцентные белки, которые являются генетически кодируемыми метками. Их уникальные свойства по сравнению с синтетическими красителями позволяют проводить микроскопию интактных структур, порой даже непосредственно в живых клетках. GFP-подобные флуоресцентные белки нашли широчайшее применение в исследовании структурно-функциональных аспектов живых систем, для создания генетически кодируемых биосенсоров, и, наконец, в сверхразрешающей микроскопии. Особые свойства некоторых из флуоресценнтных белков, так называемых фотоконвертируетых и фотоактивируемых, делает возможным их применение для исследования клеточных структур с нанометровым разрешением.

Таким образом, диссертационная работа Соловьева И.Д. представляется значимой и актуальной для фундаментальной биологии и химии живых систем.

Научная новизна.

Автором впервые получены мономерные формы флуоресцентного белка SAASoti из коралла *Stylocoeniella armata.* Уникальность данного белка состоит в высокой скорости фотоконверсии, что делает его привлекательным для использования в различных методах микроскопии, в т.ч. сверхвысокого разрешения. Однако дикий тип белка SAASoti существует в виде тетрамеров, склонных к образованию агрегатов большей молекулярной массы, что затрудняет его использование в качестве флуоресцентной метки. Поэтому для его использования в качестве флуоресцентной метки необходима его мономеризация, которая была осуществлена в работе путем замены аминокислотных остатков в димеризационных и тетрамеризационных интерфейсах.

В работе впервые было обнаружено свойство обратимого фотопереключения (перехода из зеленой флуоресцентной формы в темную под действием света λ=470 нм), что делает SAASoti уникальным бифотохромным флуоресцентным белком.

На основе SAASoti впервые создан и протестирован уникальный сенсор для детекции активности каспаз, основанный на FRET-паре из белков SAASoti и KFP.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что диссертационная работа Соловьева И.Д. обладает достаточной новизной.

Практическая значимость работы

Прежде всего, практическая значимость работы состоит в получении мономерной формы белка SAASoti. Мономерные флуоресцентные белки имеют гораздо более широкий спектр применений за счет того, что их олигомерное состояние не нарушает нативное олигомерное состояние того

белка, с которым он сшит в химеру. Напротив, ди- и тетрамерные флуоресцентные белки имеют ограниченный круг применений.

Высокая скорость фотоконверсии мономерных форм SAASoti ведет к увеличению скорости регистрации изображений и, как следствие, к использованию меньших доз облучающего света и снижению фотодинамического воздействия на живые клетки.

Обладая уникальной способностью к двум видам фотопревращений (необратимой фотоконверсии из зеленой в красную форму и обратимому фотопереключению из флуоресцентной в темную форму), SAASoti имеет высокую практическую значимость для использования в субдифракционных методах флуоресцентной микроскопии.

Достоверность и обоснованность научных положений, результатов и выводов.

Выводы и основные положения, выносимые на защиту, базируются на анализе полученных диссертантом экспериментальных результатов. Достоверность результатов подтверждается использованием современных методов исследования и методов статистической обработки.

Основные положения диссертационной работы были доложены автором и обсуждены на многих отечественных и международных научных конференциях, включая ADFLIM (Сочи, Октябрь 2016 г.), Saratov Fall Meeting (Саратов, Октябрь 2017 г.), Ломоносов-2018 (Москва, Апрель 2018 г.), Biocatalysis-2019 (Санкт-Петербург, Июнь 2019 г.), Topical Problems of Biophotonics (Нижний Новгород, Июль 2019 г.).

По результатам данной работы было опубликовано 4 статьи в журналах, которые индексируются в Web of Science, Scopus и РИНЦ, в трех из которых соискатель является первым (ключевым) автором, а также 6 тезисов на международных конференциях. Данные публикации также подтверждают достоверность данных и обоснованность выводов и положений, выносимых на защиту.

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения эксперимента, выводов, списка используемой литературы. Текст изложен на 106 страницах и включает 41 рисунок, 8 таблиц и 2 приложения. Список литературы содержит 112 ссылок. **Во введении** обоснована актуальность исследования, четко сформулированы его цель, и поставлены соответствующие заданной цели задачи. Показана научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы занимает 22 страницы машинописного текста. В главе описаны и проанализированы современные представления о флуоресцентных белках, их олигомерного состояния и способах мономеризации их олигомерных версий, описаны принципы микроскопии сверхвысокого разрешения, использование флуоресцентных белков в субдифракционной микроскопии. Приятно, что автор не стал раздувать обзор литературы подробным описанием общеизвестных для специалистов фактов про флуоресцентные белки, а сосредоточилдся на более подробном описании аспектов, имеющих важность для данной работы. В частности, прекрасной информативностью обладает раздел обзора, посвященный механизмам фотоконверсии и фотоактивации флуоресцентных белков.

Глава «Экспериментальная часть» занимает 12 страниц машинописного текста и включает себя несколько подразделов, в которых подробно описаны реактивы и материалы, используемые в экспериментах, приборная база, а также сами экспериментальные процедуры, начиная от дизайна векторов, получения и изучения рекомбинантных белков, до экспериментов по микроскопии сверхвысокого разрешения и флуоресцентной корреляционной микроскопии. Выбор методов исследования адекватен цели исследования и позволяет решить поставленные автором задачи, что чрезвычайно важно, учитывая широкий спектр различных экспериментальных образцов и методик, использованных для

достижения поставленной цели. Методы описаны достаточно подробно и соответствуют современному уровню развития науки.

Раздел «Результаты» содержит несколько блоков исследований. Первый блок посвящен созданию неагрегирующей и мономерной формы белка SAASoti. Первый появившийся в арсенале ученых белок GFP из медузы Aequorea Victoria, и его последующие близкие аналоги, были мономерными. Как оказалось впоследствии, это было большое везение, так как все флуоресцентные белки из кораллов оказались тетрамерами. Это означало, что их применение в качестве меток в химерных белках практически невозможно, т.к. тетрамерная форма флуоресцентного белка будет нарушать олигомерное состояние целевого белка. Много лет продолжались в конце концов увенчавшиеся успехом попытки делать белки из кораллов мономерными и неагрегирующими.

Для фотоактивируемых и фотоконвертируемых белков мономерность является обязательным условием успешного применения, и автором была осуществлена успешная попытка мономеризации SAASoti путем внесения аминокислотных замен в интерфейсы тетрамеризации. В результате был получен белок, находящийся преимущественно в мономерном состоянии.

В следующем разделе автор определяет базовые фотохимические параметры мутантых форм SAASoti: спектр, коэффициент молярной экстинкции, квантовый выход, pKa, причем как для исходной зеленой, так и для фотоконвертированной красной.

Далее автором охарактеризован процесс фотоконверсии мутантов SAASoti, определены кинетические параметры переходов между формами и фотостабильность, как на выделенном белке, так и в клетках. Примечательно, что фотоконверсия V127T SAASoti происходит гораздо быстрее, чем в белке Dendra2, а значит снижается фотонная нагрузка на клетку, уменьшая фототоксичность. Другим интересным результатом данного раздела стала идентификация окисления метионина 164 при облучении зеленой формы SAASoti светом 470 нм. Фотоиндуцированные редокс-реакции не часто встречаются в аминокислотных остатках белков.

Следующий раздел работы посвящен использованию V127T SAASoti в субдифракционной микроскопии. Проведены эксперименты по локализации виментина, белка промежуточных филаментов, в субдифракционном режиме фотоактивационной локализационной микроскопии (PALM).

Наиболее интересным, с моей точки зрения, является блок экспериментов по использованию SAASoti в составе FRET-сенсора для детекции апоптоза. Белок KFP, являющийся акцептором во FRET-паре, имеет очень низкий квантовый выход и хорошо поглощает в красной области. Ранее донором во FRET-паре подобного сенсора являлся белок TagRFP, который имеет постоянную красную флуоресценцию. Однако для детекции с помощью помощью метода флуоресцентной корреляционной микроскопии обычные концентрации флуорофоров при оверэкспрессии белков очень велики. В случае SAASoti, исследователь может самостоятельно задавать концентрацию красной формы, переключая зеленую форму в красную короткими импульсами 405 нм лазера. Такой сенсор удалось создать автору работы, а также продемонстрировать его применимость для детекции каспазной активности. Детекция времени жизни флуоресценции донора дала предсказуемый интерпретируемый результат. Зависимость же скорости диффузии SAASoti от активности каспазы, как оказалось, носит более сложный характер: диффузия SAASoti, вышедшего из комплекса с KFP, не совпадает с таковой для свободного SAASoti. Тем не менее, сенсор пригоден для детекции апоптоза любым методом прямой детекции FRET.

Исключительно хорошо написан раздел «Обсуждение результатов». В нем не просто перечисляются еще раз основные результаты работы, но и приводится их подробный анализ и обсуждение.

По диссертации можно сделать следующие замечания:

1. В обзоре литературы следовало бы подробно описать методы сверхразрешающей микроскопии. В диссертации им посвящено всего три

страницы, которые дают только поверхностное представление о принципах этих методов, в то время как это один из основных смысловых блоков работы. В микроскопии сверхвысокого разрешения есть множество интересных аспектов, от принципа и инструментов до анализа данных, которые можно было бы раскрыть подробнее.

2. При получении мономерной формы SAASoti было выявлено, что остаточная димеризация белка при высоких концентрациях опосредована, вероятно, дисульфидной связью между мономерами, так как она пропадает при обработке образца восстановителем DTT. Странно, что автор не попытались заменить эти остатки, чтобы не ограничивать применимость белка только в восстанавливающих компартментах клетки.

3. При определении коэффициента молярной экстинкции и квантового выхода мутантных форм SAASoti было бы корректно сравнивать эти параметры не только с белками Dendra2 или mEos2, но и с SAASoti дикого типа, чтобы понять, насколько белок потерял яркость при мономеризации.

4. Раздел, посвященный использованию SAASoti в субдифракционной микроскопии, лаконичен, хотя по смыслу он мог бы быть одним из основных в работе.

5. В разделе про использование сенсора для детекции активности каспазы-3, SAASoti-23-KFP, автор утверждает, что ему удалось зарегистрировать изменение вязкости в клетке при активации каспазы, однако соответствующие данные не приведены.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.04 – «Биохимия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6

Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Соловьев Илья Дмитриевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
заведующий лабораторией редокс-регуляции НИИ трансляционной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Белоусов Всеволод Вадимович

22.11.2019

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 336-82-33, e-mail: belousov@ibch.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1,

Тел.: +7 (495) 627-24-00; e-mail: rsmu@rsmu.ru

Подпись сотрудника Белоусова Всеволода Вадимовича удостоверяю:

Начальник отдела кадров
ФГАОУ ВО РНИМУ
им. Н.И. Пирогова Минздрава России
М.В. Николаева
22. ноября 2019 г.

22.11.2019