

Министерство науки и высшего образования  
Российской Федерации (Минобрнауки  
России)

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК  
(ИНЦ РАН)**

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4  
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41,  
эл.адрес: [cellbio@incras.ru](mailto:cellbio@incras.ru); <http://www.cytspb.rssi.ru/>

15.05.2023 № 12216-662-181

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИЦН РАН

Член-корр. РАН

*А.И.Томалин*  
15 май 2023 г.



#### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук, **Гаврикова Алексея Семеновича** на тему: “Флуороген-активирующие белки для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках” по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

#### Актуальность темы выполненной работы

Флуоресцентные метки, основанные на флуороген-активирующих белках, состоят из двух компонентов: лиганд-связывающего белка и низкомолекулярного хромофора, квантовый выход которого существенно увеличивается при связывании с белком. В настоящее время существует не так много систем, которые обладали бы высокой яркостью и стабильностью хромофора, а также высокой плотностью мечения в живых системах. На функционирование многих белков влияет размер флуоресцентной метки, поэтому необходимо стремиться, по возможности, уменьшить ее размер. Разработка системы мечения, которая отвечала бы всем этим требованиям, является актуальной задачей. Оптимизация пар флуороген-связывающего белка, в качестве которого использовали липокалин либо его мутантные формы, и хромофор, из числа производных GFP, и являлось основной целью работы.

Актуальной задачей является также исследование белок-белковых взаимодействий. Одним из наиболее прямых методов, используемых для этих целей, является метод, основанный на регистрации ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET), однако в живом образце сложно получить контрольное измерение, при котором перенос

энергии отсутствует. Использование флуороген-активирующего белка в качестве модулируемого акцептора упрощает определение эффективности переноса энергии за счет возможности попеременного присоединения и отмывания хромофора из среды. Набор FRET пар с моделируемыми акцепторами FRET крайне ограничен. Поэтому, создание модулируемого акцептора на основе липокалина с синтетическим хромофором  $\text{mka67}$ , созданного на основе хромофора GFP, для изучения белок-белковых взаимодействий представляет особый интерес и является актуальной задачей.

### **Общая характеристика и структура диссертационной работы**

Работа построена по стандартной схеме и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Текст изложен на 155 страницах, содержит 51 рисунок, 6 таблиц и 211 ссылку на использованную литературу.

*Введение* содержит описание цели и задач исследования, актуальности, новизны и практической значимости полученных результатов. Приведена информация об опубликованных по теме исследования статьях и докладах на конференциях.

*Обзор литературы*, хотя и краткий, дает достаточно хорошее представление об истории развития метода флуоресцентного мечения, разнообразия существующих в настоящее время флуоресцентных меток, ограничению разрешающей способности традиционных методов визуализации клеточных объектов из-за дифракционного предела Аббе. В заключительной части обзора рассматриваются основы метода микроскопии сверхвысокого разрешения и, в частности, метода локализационной микроскопии, позволяющего преодолеть дифракционный предел Аббе за счет регистрации отдельных фотонов флуоресцентных молекул, разделенных в пространстве и времени. Разработке этого метода фактически и посвящена диссертационная работа А.С. Гаврикова.

Раздел *«Материалы и методы»* содержит необходимую информацию по использованным в работе молекулярно-биологическим процедурам, выделению и очистке белков и измерению эффективности FRET пар *in vitro* и *in cellulo*, а также о методах микроскопии и наноскопии.

Раздел *«Результаты и их обсуждение»* содержит описание полученных экспериментальных результатов и их интерпретацию. Работа имеет две смысловые части.



В первой части автор адаптирует систему мечения на основе липокалина и синтетических хромофоров для наноскопии, измеряет важные для наноскопии параметры меток, такие как молекулярная яркость, фотостабильность. В этой части автор тестирует сплит-системы, созданные на основе мутантов липокалина, в условиях наноскопии. Гавриковым А.С. показано, что варианты липокалина DiB3/F74V и DiB3/F53L с хромофором M739 могут быть использованы для двухцветного мечения в условиях наноскопии. Также было показано, что вариант DiB3/F53L с хромофором M739 обладает достаточной фотостабильностью для длительной съемки в условиях наноскопии и получении временного разрешения меченых структур в живых клетках. Полученная сплит-система на основе липокалина DiB2 с хромофором M739 показала большую фотостабильность, чем полноразмерный белок. В случае с липокалина DiB-RM, сплит-система на его основе по параметрам фотостабильности и молекулярной яркости оказалась хуже по сравнению со сплит системой на основе полноразмерного белка.

Во второй смысловой части раздела «Результата и обсуждения» автор обсуждает результаты разработки FRET пар на основе флуоресцентных белков в качестве доноров и системы липокалин:хромофор в качестве модулируемого акцептора. Найденная пара с высокой эффективностью FRET была протестирована в условиях широкопольной микроскопии в составе биосенсоров для определения натяжение в фокальных контактах и эпигенетическую модификацию H3K9me3. На примере биосенсора натяжения автор показывает преимущество модулируемости акцептора в виде многократного измерения FRET в живой клетке. Помимо этого, автор тестирует пару в задаче детекции белок-белковых взаимодействий и визуализирует взаимодействие белков 14-3-3 и YAP1 в условиях широкопольной флуоресцентной микроскопии. Гавриковым А.С. было установлено, что два новых флуоресцентных белка mAvicFP1 и AausFP1 могут быть использованы для регистрации FRET на уровне одиночных молекул. Также было показано уменьшение “времени жизни” локализаций белка mNeonGreen в условиях наноскопии после активации акцептора DiB1:mka67.

### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

В результате данной работы были найдены варианты липокалина DiB3/F74V и DiB3/F53L, показавшие значительно большую фотостабильность относительно родительских

вариантов. Также, за счет спектральных различий комплексов этих вариантов с хромофором M739 была проведена наноскопия сразу двух меченых структур в живых клетках. С использованием варианта DiB3/F53L была проведена длительная непрерывная съемка виментина в живой клетке. Было показано, что даже через 15 минут непрерывного измерения количество локализаций остается достаточным для реконструкции распределения виментина. Были протестированы сплит-системы на основе вариантов липокалина DiB2 и DiB-RM. Было показано, что липокалин DiB2-сплит имеет лучшие показатели фотостабильности и молекулярной яркости по сравнению и полноразмерным белком.

Помимо этого, была создана FRET пара mNeonGreen-DiB1 с красным хромофором mka67, которая показала высокую эффективность переноса энергии. Была показана модулируемость данной пары и измерение эффективности FRET в динамике в живых клетках, как в тестовом режиме в условиях белка слияния FRET пары с гистоном H2B, так и в составе биосенсора для определения натяжения в фокальных контактах. С помощью пары mNeonGreen-DiB1:mka67 впервые было визуализировано взаимодействия белков 14-3-3 и YAP1 в условиях широкопольной микроскопии.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследования**

Исследование проведено на высоком методическом уровне. Используются современные методы молекулярной биологии, генетической инженерии и микроскопии. Достоверность приведенных данных подтверждена статистически.

### **Вопросы и замечания.**

Замечаний по сути работы нет, достоверности полученных результатов, сделанных выводов. Замечания касаются оформления текста и отдельных неудачных фраз.

1. Список сокращений. Очень хорошо, что такой список есть, однако, большинство сокращений на английском языке, а расшифровка по-русски и читателю может быть непонятно происхождение некоторых сокращения. Например, BODIPY – 4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен, DFHBI – 3,5-дифлуоро-4-гидроксибензилиден-



имидазолинон. Некоторые расшифровки ничего не объясняют или крайне неудачны. Например, LOV – Свет кислород вольтаж, LSS – Длинный Стоксовский сдвиг (?).

2. Фраза «Появление новых методов, таких как, например, локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения, основанная на регистрации вспышек флуоресценции отдельных молекул и расчета их математического центра, накладывает определенные требования на используемую флуоресцентную метку, которым обычные флуоресцентные белки не удовлетворяют» и использование во Введении термина «вспышка» неудачно. На самом деле речь идет о световых импульсах, обусловленных единичными фотонами из определенных точек объекта, где локализован хромофор. Вспышка, ассоциируется с чем-то совсем другим. Именно в силу этого, изображение точки, уширенной за счет эффекта дифракции, может быть заменено на точку в центре наблюдаемой на экране вспышки.

3. Обозначение символов, входящих в формулу, вводится с красной строки словом «Где» с заглавной буквы.

4. Задачи исследования (стр. 9) в п.1 и 3 сформулированы не лучшим образом, хотя можно догадаться, о чем идет речь. «В условиях флуоресцентной микроскопии одиночных молекул определить свойства вариантов липокалина, полученных в результате рационального дизайна на основе анализа кристаллической структуры и моделирования комплекса липокалин:хромофор»; «Определить применимость систем бимолекулярной комплементации на основе липокалинов для наноскопии в живых клетках»

5. Заголовок Раздела 3.12.2 «По уменьшению времени жизни флуоресценции донора.» на стр 72 выглядит очень странно.

Список не слишком удачных выражений можно продолжить.

Большинство рисунков оформлены очень хорошо, исключение составляет рисунок 40 на стр. 124.

### **Заключение**

Диссертационная работа Гаврикова Алексея Семеновича “Флуороген-активирующие белки для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках” соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. №

748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 г. №1690), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу Гаврикова Алексея Семеновича “Флуороген-активирующие белки для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках” был обсужден и одобрен единогласно на семинаре Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков Института цитологии РАН 10 мая 2023 года протокол №4.

Главный научный сотрудник Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков ИНЦ РАН, доктор физ.-мат. наук, профессор  
E-mail: kkt@incras.ru



**ТУРОВЕРОВ Константин Константинович**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4, Телефон: +7 (812) 297-18-29, E-mail: cellbio@incras.ru, сайт: incras.ru

Подпись Туроверова К.К. заверяю  
Ученый секретарь  
Федерального государственного учреждения науки  
Института цитологии Российской академии наук  
кандидат биологических наук



И.И. Тюряева