

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Гаврикова Алексея Семеновича** "Флуороген-активирующие белки для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

В последнее время очень широкое значение и распространение в микроскопии получила флуоресцентная микроскопия одиночных молекул. Основными требованиями, которые флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения накладывает на флуоресцентные метки являются высокая фотостабильность, молекулярная яркость и высокая плотность мечения. Несмотря на довольно большой набор разработанных для наноскопии флуоресцентных меток, лишь немногие из них обладают комбинацией из всех этих свойств.

Также для мечения некоторых белков важен размер метки. Один из подходов к его минимизации – это создание систем бимолекулярной комплементации. Примером наиболее известной из таких систем является авидин-биотиновая. Однако, она имеет определенные ограничения и не всегда может эффективно использоваться в наноскопии..

Флуороген-активирующие белки - это флуоресцентные метки, состоящие из двух компонентов: лиганд-связывающего белка и низкомолекулярного хромофора, флуоресценция которого усиливается при связывании с белком. В данной работе тестируется подобная метка, основанная на нековалентном взаимодействии мутантных форм бактериального липокалина и синтетических хромофоров аналогичных хромофору GFP. Обмениваемость хромофора обеспечивает высокую фотостабильность сигнала и, как следствие, позволяет производить измерения в течении длительного промежутка времени необходимого для накопления сигнала достаточного для полной реконструкции меченной внутриклеточной структуры.

Помимо мечения в методах субдифракционной микроскопии, система липокалин-хромофор в данной работе используется как модулируемый акцептор FRET для детекции белок-белковых взаимодействий. Измерение эффективности FRET по интенсивности флуоресценции с использованием обычных флуоресцентных белков требует сложных контрольных измерений и трудоемкой интерпретации полученных данных. Модулируемые акцепторы упрощают получение контрольных измерений в случае измерения FRET по интенсивности флуоресценции, а также позволяют легко проводить длительную детекцию FRET в живых клетках. Обычно для таких целей используют методы фотовыцветания акцептора. на сегодняшний день, набор модулируемых акцепторов, основанных на принципе обратимого связывания хромофора сильно ограничен.

Таким образом, адаптация новой системы мечения для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий представляет большой интерес в области микроскопии сверхвысокого разрешения и детекции FRET.

Диссертационная работа Гаврикова А.С. построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: Введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы.

Работа изложена на 155 страницах, содержит 51 иллюстрацию и 6 таблиц. В работе используется 211 источников, среди которых представлены как классические работы по теме, так и самые свежие исследования последних лет.

Во введении автор диссертации обсуждает актуальность и научную новизну, а также теоретическую и практическую значимость полученных результатов. В этом разделе также перечисляются выделенные в рамках работы задачи, которые полностью соответствуют поставленной цели.

Обзор литературы состоит из шести смысловых блоков. Первый блок содержит информацию о развитии флуоресцентного мечения и современных разработках в этой области. В этом блоке рассмотрена история развития флуоресцентных меток с момента выделения первого флуоресцентного белка до наших дней. Описаны разнообразные группы флуоресцентных меток, такие как белки семейства GFP, бактериальные фитохромы (BphPs), флавиномононуклеотид-связывающие белки FbFP, ферментативные системы мечения (HaloTag, SNAP-tag, RYP-tag) и другие.

Во втором разделе описаны различные подходы к локализационной микроскопии, описываются физические принципы преодоления дифракционного предела для получения более высокого разрешения меченых структур. Также описаны различные подходы к локализационной микроскопии с использованием флуоресцентных меток, таких как органические красители и фотоактивируемые флуоресцентные белки.

В третьем разделе описывается резонансный перенос энергии (FRET) и его применение в биологических исследованиях. Довольно подробно описана история разработки метода резонансного переноса энергии (FRET). Описаны различные подходы к детекции переноса энергии с помощью флуоресцентных меток, в том числе с помощью фотопереключаемых флуоресцентных белков (фотохромный FRET). Кратко приведены области применения FRET в биосенсорах и для изучения белок-белковых взаимодействий. Затронута тема детекции FRET на уровне одиночных молекул. Однако автор не отличает диполь молекулы в основном или возбужденном состоянии от дипольных моментов переходов из возбужденного состояния в основное (для донора) и дипольного момента перехода из основного состояния в возбужденное. Эти диполи возникают только в момент поглощения или излучения кванта света. Автор ни разу не использует эти термины, хотя именно их ориентация и определяет значение ориентационного фактора, и именно они приведены на рисунке 4. Кроме того, для измерения времен жизни флуоресценции используется не просто счет одиночных фотонов, а скоррелированный счет одиночных фотонов (TCSPC, а в русской литературе – счет по схеме совпадений)

В четвертом разделе описаны системы бимолекулярной комплементации и их недостатки при использовании в изучении белок-белковых взаимодействий, а именно необратимость связывания и спонтанная самосборка фрагментов.

Пятый раздел описывает созданные на данный момент системы мечения на основе флуороген-связывающих белков-усилителей флуоресценции, которые

связывают хромофор нековалентно. Приведена история развития данного класса флуоресцентных меток, начиная с антител на малахитовый зеленый и тиазоловый оранжевый, заканчивая самой последней разработкой - HaloTag7 с новым классом синтетических хромофоров. Также подробно описана популярная и получившая широкое распространение система мечения на основе белка FAST. Автор также приводит недостатки существующих систем мечения на основе флуороген-активирующих белков в условиях наноскопии.

Шестой раздел описывает ранее разработанную систему мечения на основе бактериального липокалина (DiB) и синтетических хромофорах аналогичных хромофору GFP, которая адаптируется в данной диссертации для применения в локализационной микроскопии и в качестве модулируемого акцептора FRET для изучения белок-белковых взаимодействий.

Раздел "Материалы и методы" описывает широкий набор современных методов и подходов молекулярной и клеточной биологии, использованных в работе. В рамках работы было использовано множество современных методов: молекулярное клонирование Golden Gate, экспрессия и очистка рекомбинантных белков, флуориметрия, флуоресцентная микроскопия (широкопольная, конфокальная и локализационная). Совместно с коллабораторами была проведена микроскопия времени жизни флуоресценции, а также *in vitro* измерения времени жизни флуоресценции. Анализ изображений и статистическая обработка данных проведены с помощью современных программных пакетов.

Раздел "Результаты и их обсуждение" содержит 6 разделов. Первый раздел описывает то, что кристаллизация комплекса липокалина DiB3 с хромофором M739 коллабораторами позволила подробно проанализировать взаимодействие хромофора с аминокислотными остатками в лиганд-связывающем кармане липокалина. Это в свою очередь позволило провести рациональный мутагенез и получить варианты липокалина с улучшенными свойствами. Так, были выявлены варианты DiB3/F74V и DiB3/F53L, которые в комплексе с хромофором M739 в условиях наноскопии живых клеток превосходят по показателям молекулярной яркости и стабильности плотности мечения родительские мутанты липокалина. Было показано, что длительная съемка варианта DiB3/F53L на протяжении многих минут при непрерывном облучении позволяет получить разрешение реконструируемой внутриклеточной структуры во времени в живой клетке.

Во втором разделе результатов было проведено двухцветное мечение в условиях наноскопии с использованием новых вариантов липокалина DiB3/F74V и DiB3/F53L.

В третьем и четвертом разделах описывалось создание и тестирование, предложенных коллабораторами систем бимолекулярной комплементации на основе липокалина DiB2 и смоделированного мутанта DiB-RM в условиях наноскопии. Сплит-система на основе липокалина DiB2 показала большую

стабильность плотности мечения и молекулярную яркость относительно полноразмерного липокалина в то время, как сплит-система на основе мутанта DiB-RM оказалась по этим показателям хуже полноразмерного DiB-RM. Однако, обе системы обладали тенденцией к спонтанной самосборке.

В пятом разделе автор описывает применение "красного" комплекса липокалина DiB1 с хромофором mka67 с пиком эмиссии на 625 нм в условиях наноскопии.

Шестой раздел посвящен разработке и тестированию FRET пар с модулируемым акцептором на основе вариантов липокалина с хромофорами. В результате *in vitro* автору удалось найти зелено-красную пару с большой эффективностью переноса энергии mNeonGreen-DiB1:mka67. Данная пара была протестирована в *in cellulo* условиях на модели белка слияния с гистоном H2B. Было определено время жизни флуоресценции донора mNeonGreen до и после добавления хромофора mka67 и активации акцептора в *in vitro* и *in cellulo* условиях. На белке слияния FRET пары с гистоном была показана возможность многократного измерения эффективности FRET с помощью попеременной отмывки и добавления хромофора в клеточную среду. FRET пара mNeonGreen-DiB1:mka67 была успешно использована для адаптации сенсора на триметилирование H3K9 и на натяжение в фокальных контактах клеток. С помощью адаптированного сенсора на натяжение в фокальных контактах было показано динамическое изменение натяжения в живой клетке. Также впервые с помощью детекции FRET с использованием флуоресцентной микроскопии было визуализировано взаимодействие белков 14-3-3 и YAP1.

В заключительной части шестого раздела было показано, что недавно открытые флуоресцентные белки mAvicFP1 и AausFP1 обладают способностью спонтанно мигать при мощном облучении возбуждающим светом. Однако, данные белки в паре с акцептором DiB1:mka67 показали значительно меньшую эффективность FRET, чем mNeonGreen.

В разделе "Заключение" автор кратко обобщает основные результаты исследования, а также подчеркивает их теоретическую и практическую значимость. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Результаты диссертационной работы Гаврикова А.С. Опубликованы в 6 научных статьях в международных рецензируемых журналах и представлены в 5 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Тем не менее, как и практически любая научная работа, диссертационное исследование Гаврикова А.С. Имеет ряд недостатков, а также вызывает вопросы, которые во многом связаны с интересом оппонента к тематике исследования и не умаляют значимости полученных результатов, а также не подвергают сомнению степень их достоверности. Кроме уже указанных ранее в тексте замечаний, следует отметить, что разработанные методы не являются универсальными и работа

только выиграла бы если бы автор четко сформулировал области применения новых разработанных методов, при решении каких задач их следует применять.

По всем критериям диссертационная работа Гаврикова А.С. "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), а ее автор несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент
Заведующий
Лабораторией физической биохимии
Института биохимии им. А.Н. Баха
Федерального исследовательского центра
"Фундаментальные основы биотехнологии"
Российской академии наук
профессор, д.х.н.

Савицкий Александр Павлович

4 мая 2023 года

119071, Москва,
Ленинский проспект 33, корпус 2
Тел. +7(495)9548725. E-mail: apsavitsky@inbi.ras.ru

Подпись д.х.н. Савицкого А.П.
"Удостоверяю"
Ученый секретарь ФИЦ биотехнологии РАН
к.б.н.



Орловский Александр Федорович