

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.

Актуальность избранной темы

Успешность визуализации клеточных структур в живых клетках с помощью флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения напрямую зависит от эффективности мечения, яркости и флостабильности флуоресцентных белков. Однако, свойства имеющихся флуоресцентных белков не позволяют проводить эффективное мечение и длительную визуализацию клеточных структур со сверхвысоким разрешением в живых клетках, тем более нескольких структур одновременно. Также не разработаны эффективные FRET пары с модулируемым акцептором для визуализации белок-белковых взаимодействий и разработки биосенсоров. Таким образом, диссертационная работа Гаврикова А.С. вносит существенный вклад в развитие наноскопии и визуализации белок-белковых взаимодействий в живых клетках.

Научная новизна исследования

Работа Гаврикова А.С. посвящена разработке флуороген-активирующих белков на основе липокалина для микроскопии сверхвысокого разрешения. Впервые с помощью флуороген-активирующих белков на основе улучшенных версий липокалина DiB и DiB3, DiB1 и новых синтетических хромофоров были продемонстрированы двухцветная зелено-красная и далеко-красная субдифракционная микроскопии клеточных структур в живых клетках. Впервые с помощью разработанных сплит-систем на основе липокалинов DiB2 и DiB-RM проведена визуализация цитоскелета живых клеток с помощью локализационной микроскопии. Впервые на основе разработанной FRET пары mNeonGreen-DiB1 с модулируемым акцептором и хромофора mka67 были визуализированы взаимодействия между белками 14-3-3 и YAP в цитозоле живых клеток. На основе FRET пары mNeonGreen-DiB1-mka67 были разработаны сенсоры для визуализации метилирования гистонов и натяжений в фокальных контактах в живых клетках. Впервые с помощью mNeonGreen-DiB1-mka67 пары продемонстрирован FRET на уровне одиночных молекул. Таким образом, полученные новые флуороген-активирующие белки и сенсоры на их основе открывают возможность не только для визуализации клеточных структур со

сверхвысоким разрешением, но и для детекции белок-белковых взаимодействий, метилирования белков и натяжений в фокальных контактах живых клеток.

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

Работа изложена на 155 страницах, включая страницы со списком цитированной литературы, включает 51 рисунок и 6 таблиц. Диссертация содержит следующие стандартные разделы: «Оглавление», «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы».

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности проблемы, сформулированы цели и задачи исследования, обозначены предмет и объект исследования, актуальность и научная новизна исследования, область применения и практическая значимость исследования и опубликованные статьи и доклады на конференциях.

«Обзор литературы» включает данные о современном состоянии исследований в области флуоресцентного мечения с акцентом на мечение с помощью лиганд-связывающих белков. Даются представления о локализационной флуоресцентной микроскопии, резонансном переносе энергии FRET и способах ее детекции. Описывается применение FRET в биологических исследованиях, включая детекция FRET на уровне одиночных молекул. Приведены примеры существующих сплит-систем на основе флуоресцентных белков. Затем идет детальное описание различных классов имеющихся флуороген-активирующих белков и синтетических флуорогенов с примерами их применения в широкопольной и локализационной микроскопии. Сделан акцент на использовании липокалина для разработки на его основе флуороген-активирующих белков DiB1, DiB2, DiB3, связывающих синтетические аналоги хромофора флуоресцентного белка GFP. Описаны структурные особенности липокалина и применение его версий для визуализации цитоскелета с помощью наноскопии.

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, метод модульного клонирования "Golden Gate",

секвенирование ДНК, выделение и очистка белков из бактериальных культур, характеристика спектральных и физико-химических характеристик флуоресцентных белков, трансфекция животных клеток, широкопольная и локализационная флуоресцентная микроскопия. Кроме того, стоит отметить использование автором сложного метода детекции FRET сигнала в условиях широкоугольной и локализационной микроскопии. Методический уровень диссертации, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из 6-ти частей и содержит основные результаты работы. На первом этапе на основе анализа структурных данных были получены улучшенные версии флуороген-активирующих белков DiB1 и DiB3 на основе липокалина. На основе характеристики их свойств *in vitro* и фотостабильности в животных клетках были отобраны лучшие варианты. Затем характеристики трех найденных производных DiB3 сравнивали с помощью локализационной микроскопии цитоскелета в живых животных клетках. В итоге была найдена лучшая система мечения на основе липокалина DiB3/F53L и хромофора M739 для использования в наноскопии.

На следующем этапе работы с помощью липокалинов DiB3/F53L и DiB3/F74V в комплексе с хромофором M739 была продемонстрирована двух-цветная локализационная микроскопия структур виментина и цитокератина в живых животных клетках.

Затем были разработаны сплит-версии липокалина DiB2 и DiB-RM. Было показано успешное применение разработанных сплит-версий для визуализации волокон виментина с субдифракционным разрешением в живых животных клетках.

Далее был разработан дальнекрасный вариант липокалина DiB1 и хромофора mka67, который показал высокую эффективность в визуализации структур цитокератина в живых клетках с помощью наноскопии.

И, наконец, на последнем этапе работы Гавриков А.С. в результате скрининга разных вариантов FRET пар *in vitro* нашел FRET пару на основе липокалина-флуоресцентного белка, DiB1-mNeonGreen и красного хромофора mka67, с самой высокой эффективностью FRET около 60-75%. Работоспособность и обратимая активация найденной FRET пары с модулируемым акцептором была подтверждена в живых животных клетках при мечении нуклеосомных гистонов. Затем с помощью подобранной FRET пары удалось успешно детектировать белок-белковые взаимодействия между гистонами H2B в составе нуклеосомы, промежуточными филаментами виментина и впервые между белками 14-3-3 и YAP в живых клетках. На основе FRET пары mNeonGreen-DiB1:mka67 удалось разработать биосенсоры на метилирование гистона H3 и на натяжение в фокальных

контактах. С помощью разработанных сенсоров удалось успешно регистрировать эпигенетическую модификацию хроматина и изменение натяжения в местах прикрепления клеток к поверхности во время клеточного движения. Был проведен поиск доноров среди ярких зеленых флуоресцентных белков для комплекса DiB1:mka67 для наноскопии и найден наиболее оптимальный белок mNeonGreen. Наконец, с помощью FRET пары mNeonGreen-DiB1:mka67 был качественно продемонстрирован FRET между гистонами H2B на уровне одиночных молекул.

Текст сопровождается 211-ю ссылками, большая часть которых относится к работам последнего десятилетия, в том числе 2023 года.

Диссертационная работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». Все научные положения, заключения и выводы достоверны, обоснованы, новы и полностью отражают полученные научные результаты.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертационная работа полностью отражена в шести научных статьях, опубликованных автором в зарубежных журналах IJMS, BBRC, PLOS Computational Biology, ACS Chem. Biol., и Sci. Rep. с высокими импакт-факторами, результаты исследования доложены на пяти отечественных и международных конференциях.

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

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

Замечания к работе:

Отсутствуют.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным требованиям

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.

