

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр
Сибирского отделения
Российской академии наук»
(КНЦ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН)**



660036, г. Красноярск,
ул. Академгородок, 50
Тел. (391) 243-45-12, факс 290-53-78
E-mail: fic@ksc.krasn.ru
www.ksc.krasn.ru
ОКПО 05239177, ОГРН 1022402133698
ИНН/КПП 2463002263/246301001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФИЦ КНЦ СО РАН

д.ф.-м.н. Волков Никита Валентинович

«11» сентября 2017г.

от 11.09.17 № 356-11
на _____

ОТЗЫВ

**ведущей организации на диссертацию Божановой Нины Георгиевны
“Разработка и изучение флуоресцентных меток методами моделирования и
молекулярной эволюции белков“, представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 –
молекулярная биология**

Открытие возможности флуоресцентного мечения целевых белков в живых клетках и организмах позволило сделать много важных фундаментальных и прикладных открытий в различных областях биологии. И хотя эта техника в целом уже не является новой, постоянное совершенствование технологий детекции и обработки получаемой информации расширяет её возможности. Одновременно с этим изменяются и требования к используемым в работе флуоресцентным меткам. Таким образом, создание новых генетически кодируемых флуоресцентных маркеров, обладающих определенными свойствами, несомненно остается актуальной задачей, для решения которой часто требуется глубокое понимание принципов работы уже существующих флуоресцентных меток.

Диссертация Божановой Нины Георгиевны посвящена изучению и созданию новых инструментов для флуоресцентного мечения белков *in vivo* за счёт сочетания современных методов компьютерного анализа и исследований свойств модельных

соединений с классическими и современными подходами экспериментальной биологии.

Диссертационная работа Божановой Н.Г. изложена на 138 страницах машинописного текста и состоит из разделов “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”, “Список сокращений” и “Список литературы”.

Обзор литературы состоит из трёх частей, обобщающих материалы более 150 научных публикаций. В первой части автор характеризует существующие методы флуоресцентного мечения белков, анализируя их слабые и сильные стороны и область применения. Вторая и третья части посвящены знакомству с основными методами, используемыми диссертантом в своей работе: дан обзор практических способов создания белков с новыми свойствами и моделированию. Раздел в полной мере подготавливает читателя к дальнейшему изучению работы Божановой Н.Г.

Раздел “Результаты и обсуждение” содержит две части. Первая часть работы посвящена флуоресцентным белкам на основе вариантов GFP, содержащим триптофан в составе хромофора. В результате мутагенеза красного белка FusionRed диссертанту удалось получить две группы белков (обладающих жёлтой и оранжевой флуоресценцией), что не было описано ранее. Анализируя сначала биохимические свойства двух характерных представителей обнаруженных групп, а затем исследуя поведение синтетического аналога предполагаемого хромофора, автору удалось доказать наличие разрыва полипептидной цепи и формирование нейтрального кетонного хромофора в обеих группах белков. Последующее моделирование спектров возможных изомеров хромофора позволило дать объяснение наблюдаемому различию спектральных свойств.

Вторая часть раздела посвящена работе со сравнительно новым семейством флуоресцентных меток – флуороген-активирующими белками. Диссертант поставила своей целью разработать протокол создания новых пар флуороген-белок, пригодных для мечения белков интереса *in vivo*. В качестве потенциальных флуорогенов были выбраны аналоги хромофоров флуоресцентных белков, обладающие низкой токсичностью и высокой флуорогенностью. Сначала при помощи программы AutoDoc Vina был проведен поиск потенциальных флуороген-активирующих белков среди структур, опубликованных в базе данных PDB. В дальнейшем протокол был расширен за счёт добавления стадии моделирования - предсказания влияния ограниченного количества точечных мутаций на структуру белка и лиганд-связывающего кармана при помощи программы MODELLER. Более

детальное исследование наиболее перспективных вариантов проводилось при помощи различных протоколов программы Rosetta.

Как в случае скрининга белков из базы данных PDB, так и в случае *in silico* мутагенеза диссертанту удалось получить пары белок–лиганд, характеризующиеся увеличенным флуоресцентным сигналом комплекса в сравнении с сигналом свободного хромофора. Физико-химические характеристики пар на основе мутантов бактериального липокалина B1c с борированным аналогом хромофора GFP оказались пригодными для флуоресцентного мечения белков интереса *in vivo*. При этом была показана возможность их детекции при помощи широкопольного и конфокального флуоресцентного микроскопа, а также использования для методов микроскопии сверхвысокого разрешения. Дальнейший *in vitro* и *in silico* мутагенез этих белков позволил получить варианты с улучшенными свойствами.

В целом диссертационная работа представляет собой завершенное научное исследование, написана тщательно, оставляет приятное впечатление. К замечаниям можно отнести следующее: в конце Главы 1 (Обзор литературы) уместным было бы заключение об основных современных тенденциях в области проведенного автором диссертации исследования и обоснованием выбранного на основе анализа литературных данных направления работы; на Рис.40 не приведены разбросы; в тексте имеются опечатки. Однако сделанные замечания не влияют на общее положительное впечатление от работы и не снижают научной ценности полученных результатов.

Полученные диссертантом результаты имеют как теоретическое, так и прикладное значение. Установление структур хромофоров новых флуоресцентных белков и изучение влияния разнообразных факторов на их спектральные свойства является важным шагом на пути к предсказанию свойств флуоресцентных белков по первичной аминокислотной последовательности и рациональному дизайну флуоресцентных меток с желаемыми параметрами. Также для решения этих задач представляется перспективным использование современных достижений компьютерного моделирования, уже зарекомендовавших себя в различных других областях. Помимо потенциальной пользы для области в целом, представленная работа имеет немедленное прикладное значение: полученные автором работы белки могут быть уже сейчас использованы при проведении исследований по локализации, перемещению и взаимодействию белков в живых системах методами флуоресцентной микроскопии в лабораториях и научных институтах самого разного профиля: Институте цитологии и генетики СО РАН, Институте

молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Нижегородской государственной медицинской академии, Санкт-Петербургском политехническом университете и т.д.

Основные результаты в полной мере опубликованы в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Кроме того, полученные в ходе работы данные были представлены на российских и международных конференциях.

Таким образом, проведенный анализ позволяет утверждать, что диссертация Божановой Нины Георгиевны соответствует критериям, установленным “Положением о присуждении ученых степеней” (Постановление 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), результаты работы вносят значительный вклад в развитие методов молекулярной биологии, предлагая новый подход к конструированию флуоресцентных репортеров для нужд современной биологии и медицины, а сам диссертант, безусловно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - (молекулярная биология).

Отзыв на диссертационную работу Божановой Н.Г. заслушан и утвержден на семинаре лаборатории фотобиологии Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН «4» сентября 2017 года

Отзыв подготовил
Заведующий лабораторией фотобиологии
Института биофизики Сибирского отделения
Российской академии наук – обособленного
подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН, к.б.н.
Тел. 8(391)2494430;
e-mail: eugene_vysotski@ibp.ru



Е.С. Высоцкий

Почтовый адрес: Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50,
ФИЦ КНЦ СО РАН, тел.: 7 (391) 280-50-39, факс: 7 (391) 290-53-78,
e-mail: fic@ksc.krasn.ru, сайт: www.ksc.krasn.ru