

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Метелешко Юлии Игоревны
на тему: «Молекулярное моделирование мутантных форм
флуоресцентных белков на основе LOV доменов с измененными
спектральными свойствами»
по специальности 1.4.4 – «Физическая химия»

Диссертационная работа посвящена молекулярному моделированию флуоресцентных белков на основе флавиномононуклеотида, его аналогов и мутантных форм rsLOV1 и rsLOV2. В результате проведенных теоретических исследований структурных особенностей данных белков и их фотофизических свойств в работе предложены новые варианты флуоресцентных белков на основе LOV доменов, обладающих смещенными в красную область максимумами полос поглощения и испускания. Учитывая роль флуоресцентных белков в развитии методов постгеномной биологии данное исследование является весьма актуальным.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания применяемых в работе методов (глава 2), изложения и обсуждения полученных результатов (глава 3), заключения, выводов, списка сокращений и введенных обозначений, списка цитируемой литературы, включающего 85 ссылок, и 4 приложений. Материалы работы изложены на 125 страницах и содержат 72 рисунка и 23 таблицы.

Во введении обоснована актуальность работы, поставлены цель и задачи работы, описаны научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, установлены положения, выносимые на защиту.

Первая глава содержит обзор литературы по исследуемым объектам, а именно LOV доменам и флавиносодержащим флуоресцентным белкам, и предоставляет всю необходимую информацию для понимания и анализа работы.

Во второй главе описаны построение моделей для исследуемых систем и используемые в работе методы молекулярного моделирования, такие как метод классической молекулярной динамики, комбинированный метод квантовой механики / молекулярной механики, приведены протоколы выполненных расчетов.

Третья глава состоит из 5 разделов. В разделе 3.1 была решена задача подбора точечных аминокислотных замен для белка iLOV, приводящих к смещению максимумов спектральных полос поглощения и испускания. В результате были предложены 5 мутантных форм белка iLOV с красными сдвигами разной величины, и сделаны выводы о предпочтительных аминокислотных заменах.

В разделе 3.2 изучаются большие батохромные сдвиги за счет изменения хромофора в iLOV и в его мутантных формах. Рассмотрены модели iLOV с тремя разными хромофорами – 8-аминофлавинонуклеотид, 8-метиламинофлавинонуклеотид и 1-дезафлавинонуклеотид, и на их основе предложены 7 мутантных форм с большими красными сдвигами спектральных полос.

В разделе 3.3 теоретическими методами изучаются фотофизические свойства рассматриваемых белков с акцентом на создание сенсоров на основе FRET.

В разделе 3.4 рассматриваются структурные и динамические характеристики, влияющие на эффективность фотопереключения в белках rsLOV1 и rsLOV2.

В разделе 3.5 на основе полученных данных анализируются результаты экспериментальных работ, посвященных поиску вариантов

флавиносодержащих флуоресцентных белков с красными сдвигами спектральных полос.

В заключении обобщены результаты исследований и даны обоснованные **рекомендации** по практическому применению полученных в работе результатов для поиска других вариантов белка iLOV с красными сдвигами и описаны возможности дальнейшего развития работы.

Диссертационная работа представляет собой полноценное и законченное научное исследование, в котором решены актуальные научные задачи. Все перечисленные **выводы** и **положения**, выносимые на защиту, полностью обоснованы. Полученные результаты являются **новыми** и обладают несомненной **практической значимостью**. **Достоверность** полученных результатов обеспечивается квалифицированным применением современных методов компьютерного моделирования, а также валидацией протокола на системах с известными экспериментальными данными iLOV и iLOV-Q489K.

Автореферат и опубликованные работы в полной мере отражают содержание и основные выводы диссертации.

По диссертационной работе можно сделать ряд **замечаний**.

Автор совершенно правильно обращает внимание в разделе 3.3 на необходимость изучения фотофизических свойств рассматриваемых белков. Учитывая, что основной полезной характеристикой данных фотобелков является флуоресценция и механизмы передачи энергии электронного возбуждения вполне логично рассчитываются дипольные моменты переходов и атомные заряды атомов в основном состоянии. Вместе с тем, следует иметь в виду, что важную роль для функционирования фотобелков и возможностей их применения играет квантовый выход флуоресценции и параметр Стокса, определяющий интенсивность электронно-колебательного взаимодействия. Этот момент тем более интересен, что в разделе 3.5 обсуждаются проблемы,

связанные с неожиданными отклонениями флуоресцентных способностей реально полученных мутантных форм некоторых фотобелков от теоретических предсказаний. Не отвергая возможных проблем, связанных с фолдингом данных рекомбинантных белков (изложенных в диссертации) нам представляется вполне возможным также вариант с тушением флуоресценции за счет специфических взаимодействий аминокислотных остатков. Хорошо известно, что приближение Кондона для конформационно подвижных систем работает плохо и электронные волновые функции сильно зависят от координат ядер, что способствует внутренней конверсии электронного возбуждения.

Ввиду ограниченности во времени длины траекторий большую роль при проведении теоретических исследований и расчетов играет выбор начальной конфигурации системы и изучение влияния такого выбора на результат. В целом, с учетом особенностей изучаемых систем и методов мы согласны с выбором используемых начальных конфигураций. Было бы полезно в тексте диссертации уделить этому более пристальное внимание.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.4 – «Физическая химия» (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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Метелешко Юлия Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4 – «Физическая химия».

Официальный оппонент:

Доктор физико-математических наук,
профессор кафедры биоинженерии
Биологического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова»

Шайтан Константин Вольдемарович

06 июня 2023 года

Контактные данные:

тел.: +7(495)939-17-45

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.02 - Биофизика

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова», биологический факультет

Тел.: +7 (495) 939-27-76 ; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Подпись сотрудника ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова» Шайтана К.В. удостоверяю:

Ученый секретарь
Биологического факультета МГУ



Е.В. Петрова