

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Шемякиной Ирины Игоревны** «Красные и дальне-красные флуоресцентные белки, оптимизированные для мечения белков слияния», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «молекулярная биология» – 03.01.03.

Флуоресцентные белки широко используются для мечения различных структур в составе живых систем, и сейчас трудно найти молекулярно-биологическую лабораторию, которая не применяла бы их в своих исследованиях. Нобелевская премия по химии 2008-го года, присужденная «за открытие и разработку зеленого флуоресцентного белка», подчеркивает важность исследований в этой области.

Олигомеризация флуоресцентных белков ограничивает круг их применений при мечении индивидуальных белковых молекул и в качестве флуоресцентных репортеров составе биосенсоров. Кроме того, если изучаемый белок также является олигомером, возможно возникновение агрегатов более высокого порядка, что может отрицательно сказаться на жизнеспособности клетки. Лучшим решением для этой проблемы является создание мономерных флуоресцентных белков. Диссертационная работа Ирины Игоревны Шемякиной посвящена решению актуальной задачи – получению оптимальных красных флуоресцентных белков для мечения белков слияния.

Диссертация построена по канонической схеме: она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, а также списка цитируемой литературы, снабжена богатым иллюстративным материалом (содержит 18 рисунков и 2 таблицы) и написана на 101 странице. Материалы диссертации

изложены последовательно, результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют и логически развивают положения, установленные автором ранее.

В обзоре литературы Ирина Игоревна дает подробное описание структуры GFP-подобных флуоресцентных белков и их разнообразия, описывает основные области и способы применения флуоресцентных белков. Обзор литературы дает исчерпывающее представление о теме, актуальности и предыстории работы.

В следующем разделе описаны примененные в работе методы. Современный уровень использованных методов не вызывает сомнений. Особо следует отметить многообразие методов, которые охватывают следующие области: клонирование ДНК-конструкций и молекулярную биологию, работу с изолированными белками, клеточную биологию с использованием современных методов микроскопии. Это свидетельствует о высоком квалифицированном уровне диссертационной работы и самого автора.

Раздел «Результаты и обсуждение» построен по четкой логической схеме. Всего автором было получено четыре новых красных мономерных флуоресцентных белка. Для каждого полученного белка описана методика и логика получения и приведены данные, характеризующие белки *in vitro* и *in vivo*. Белок FusionRed обладает высокой яркостью флуоресценции, высокой pH- и фотостабильностью. В ходе работы было получено более 40 белков слияния FusionRed, которые были протестированы при экспрессии в клетках млекопитающих. В подавляющем большинстве случаев качество FusionRed не уступало лучшим мономерным зеленым белкам. Таким образом, FusionRed является оптимальным для мечения белков слияния красным мономерным флуоресцентным белком. На основе FusionRed было получено два обратимо фотоактивируемых и один

дальне-красный мономерные флуоресцентные белки. Важно, что во многих экспериментах автор показывает эффективность полученных белков в прямом сравнении с аналогами. Отмечу также важность того, что полученные автором белки оказались малотоксичными по тесту на эмбрионах *Xenopus laevis*. Хотелось бы, чтобы И.И. Шемякина привела основания, почему целесообразно было выбрать именно такой тест на токсичность, насколько выводы, полученные с его использованием, можно перенести на другие живые объекты.

Полученные в ходе работы данные показывают, что разработанные флуоресцентные белки могут успешно применяться для мечения исследуемых белков и клеток, многоцветного мечения, а также для создания генетически кодируемых FRET-сенсоров.

Логичным продолжением данной работы представляется усовершенствование дальне-красного мономерного флуоресцентного белка FusionRed-657, т.к. яркость флуоресцентного сигнала недостаточна для надежного использования FusionRed-657 в составе белков слияния.

В процессе изучения диссертации были замечены незначительные опечатки и неточности. Однако это не снижает хорошего впечатления от диссертационной работы.

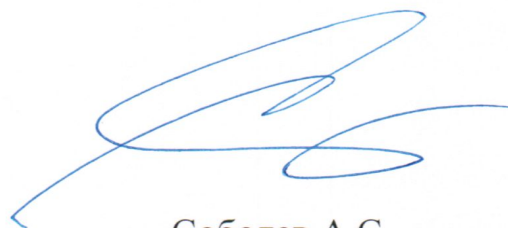
Заключение

Диссертационная работа Шемякиной И.И. является законченным научным исследованием. Результаты диссертационной работы докладывались на международных и российских научных конференциях и опубликованы в авторитетных российских и зарубежных журналах. Полученные автором результаты достоверны,

заклучения и выводы обоснованы. Полученные флуоресцентные белки получили практическое применение и используются в различных исследованиях во многих профильных учреждениях по всему миру. Результаты работы имеют большое значение для биологических исследований. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и оформлен надлежащим образом.

Диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор Шемякина Ирина Игоревна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 –«Молекулярная биология».

Заведующий лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук,
доктор биологических наук, профессор



Соболев А.С.

Контактная информация:

Почтовый адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова д. 34/5, лаборатория молекулярной генетики внутриклеточного транспорта
Телефон 8(499)135-31-00
E-mail: sobolev@igb.ac.ru и alsobolev@yandex.ru

Подпись д.б.н. А.С. Соболева удостоверяю:

Ученый секретарь Института биологии гена РАН,
Кандидат биологических наук

Г.В. Мансурова

