

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.

Актуальность исследования

Диссертационная работа Шемякиной Ирины Игоревны посвящена разработке красных мономерных флуоресцентных белков для мечения белков слияния. Флуоресцентные белки широко применяются для мечения исследуемых белков в живых клетках. Белковая метка, представляющая собой мономерный флуоресцентный белок, в большинстве случаев не нарушает естественной локализации и функций белка-мишени. Такие флуоресцентные белки являются одним из основных инструментов современной клеточной и молекулярной биологии, позволяющим изучать протекание самых разных физиологических и биохимических процессов в составе живых клеток. Бурное развитие световой микроскопии, появление новых типов микроскопов - конфокальный микроскоп, микроскоп со структурированным освещением (SIM), микроскопов сверхвысокого разрешения (PALM) – расширило спектр задач, которые могут решаться с использованием флуоресцентных белков. При этом, появление новых микроскопов выдвигает и новые требования к флуоресцентным белкам.

Большая часть задач в клеточной биологии решается с использованием зеленых флуоресцентных белков (прежде всего EGFP). Но для решения некоторых задач необходимо использовать сразу несколько флуоресцентных белков, один из которых, обычно, флуоресцирует в зеленой части спектра, второй – в красной. Однако в случае некоторых клеточных белков химерные

молекулы с красными мономерными белками, такими как mCherry, TagRFP и mKate2, имеют нарушенную локализацию и функцию, в то время как аналогичные конструкции с использованием зеленых мономеров (таких как EGFP) хорошо проявляют себя в работе. Эти проблемы объясняются остаточной слабой димеризацией красных флуоресцентных белков. Поэтому актуальной задачей оставалось получение красных мономерных флуоресцентных белков, качество работы которых в химерных конструкциях не уступало бы лучшим зеленым мономерным белкам.

Структура и объем работы

Диссертация Шемякиной И.И. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, глав, посвященных описанию материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и выводов. Диссертация изложена на 101 странице, содержит 18 рисунков и 2 таблицы. Материал диссертации изложен последовательно, результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют друг друга. Очень хорошо написан раздел Материалы и методы. Автор чрезвычайно детально описал использованные им методы, опуская малозначащие детали. Прделан внушительный объем работы, исследование проведено на высоком методическом уровне. Надежность и достоверность полученных данных обеспечивается квалифицированным применением современных молекулярно-биологических, биохимических и спектральных методов исследований. При этом автор четко характеризует свой вклад в проведенные эксперименты. Диссертационная работа носит полноценный и заверенный характер, как в научном плане, так и в оформлении. Результаты диссертационной работы опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ и докладывались на научных конференциях.

Основные результаты работы

В результате диссертационного исследования И.И. Шемякиной были получены и охарактеризованы четыре красных и дальне-красных мономерных флуоресцентных белка. Белок FusionRed по результатам HPLC сохраняет мономерные свойства при высоких концентрациях и обладает низкой цитотоксичностью. Автором было показано, что качество работы FusionRed в составе химерных конструкций с белками слияния не уступало лучшим мономерным зеленым белкам.

На основе белка FusionRed были получены белки с различными спектральными характеристиками, оптимизированные для разных экспериментальных задач. Было получено два фотоконвертируемых флуоресцентных белка. Автором установлены аминокислотные остатки, отвечающие за эффект обратимой фотоактивации белков mKateKFP1 и mKateKFP1. Также на основе белка FusionRed автором был получен красный мономерный флуоресцентный белок с батохромным сдвигом эмиссии флуоресценции, названный FusionRed-657. Показана применимость данного белка для мечения белков слияния. Описаны основные параметры, важные при практическом применении разработанных флуоресцентных белков: яркость, pH- и фотостабильность флуоресцентного сигнала, эффективность функционирования в составе химерных конструкций, уровень цитотоксичности.

Полученные белки могут быть полезны для мечения белков слияния. Прежде всего речь идет о FusionRed. Кроме мономерности этот белок характеризуется таким важным свойством, как устойчивость к фотообесцвечиванию. Низкая устойчивость к фотообесцвечиванию (по сравнению с EGFP) очень сильно лимитирует работу с лучшим на настоящее время красным флуоресцентным белком - TagRFP. Это чрезвычайно мешает при проведении, например, прижизненных наблюдений, микроскопии высокого разрешения, съемки последовательностей оптических срезов для

последующей деконволюции. FusionRed не является полной заменой TagRFP, но свою “экологическую нишу” он, вне сомнения найдет.

Замечания по работе

Представленная диссертация не лишена отдельных недостатков. Некоторые разделы диссертации написаны несколько скомкано. На мой взгляд, часть работы, связанная с характеристикой возможных путей использования полученных белков (прежде всего FusionRed) могла быть написана несколько более подробно и более конкретно. Некоторые фрагмента написаны тяжеловесно, хотя, следует признать, что число таких мест невелико (так же как очень мало число опечаток). Приведенные выше недостатки ни в коей мере не снижают общего положительного впечатления от диссертации И. И. Шемякиной.

Заключение

На основе изучения диссертации и опубликованных работ по теме диссертации, я могу заключить, что диссертационная работа Шемякиной Ирины Игоревны актуальна по теме и является логически завершенным исследованием, выполненным на современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы получены впервые и опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов не вызывает сомнений.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нем правильно отражены основные идеи и выводы диссертации, новизна и практическая значимость результатов исследований.

Все, изложенное выше, позволяет заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения и научной значимости диссертационная работа Шемякиной Ирины Игоревны «Красные и дальне-красные флуоресцентные белки, оптимизированные для мечения белков слияния», соответствует

требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям. 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 заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник
отдела электронной микроскопии
Научно-исследовательского института
физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова,
доктор биологических наук

Е.Ш.

Е.В. Шеваль

25 мая 2015г.

Контактная информация:

Почтовый адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40, отдел
электронной микроскопии

Телефон: 8(495)939-55-28

E-mail: sheval_e@genebee.msu.su

Подпись Е.В. Шевалья заверяю:

Ученый секретарь Научно-исследовательского института
физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова,
доктор физико-математических наук



З.Г. Фетисова