

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Мамонтовой Анастасии Вячеславовны на тему «Увеличение фотостабильности зеленых флуоресцирующих белков в живой клетке путем блокирования фотоиндуцированного переноса электрона», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. – молекулярная биология

Актуальность исследования

Диссертационная работа Мамонтовой А.В. посвящена такому важному вопросу как поиск путей увеличения фотостабильности зеленых флуоресцирующих белков. Флуоресцирующие белки в настоящее время являются одним из основных инструментов при изучении клеток и тканей, их структуры и протекающих в них молекулярных процессов. В настоящее время уже не только биология, но и экспериментальная медицина немислимы без постоянного применения флуоресцирующих белков. В то же время, появление новых микроскопических технологий выдвигает и новые требования к флуоресцирующим белкам. Так, очень важным свойством является устойчивость к фотообесцвечиванию, так как это необходимо для проведения длительных прижизненных наблюдений или для работы в режиме структурированного освещения.

Наибольшую важность для изучения молекулярной организации клетки имеют зеленые флуоресцирующие белки. Именно белки этой группы обладают оптимальным сочетанием важных для микроскопии характеристик (яркость, спектральные характеристики, фотостабильность, мономерность и т.д.), что делает их наиболее распространенным инструментом, в частности, при проведении прижизненных наблюдений. Именно совершенствованию этой группы флуоресцирующих белков и посвящена диссертационная работа Мамонтовой А.В. Естественно, есть много характеристик белков, которые нуждаются в совершенствовании, диссертация сфокусирована на увеличении фотостабильности зеленых флуоресцирующих белков. В работе представлены данные об экспериментах в рамках двух принципиально

разных стратегий, способных увеличить фотостабильность флуоресцирующих белков. Первая часть работы посвящена анализу условий культивирования, которые могут влиять на фотостабильность белков. Вторая часть работы связана с разработкой новых белков с требуемыми характеристиками. Все полученные данные являются новыми и крайне актуальными для развития молекулярной биологии и ее практических применений.

Структура и объем диссертации

Диссертация Мамонтовой А.В. построена по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Цели и задачи, Материалы и методы, Результаты и обсуждения, Выводы, Приложения и Список литературы. Диссертация изложена на 101 странице, содержит 37 рисунков и 5 таблиц. Список цитируемой литературы включает 94 ссылки. Материал диссертации изложен последовательно, результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют друг друга. Диссертационная работа носит полноценный и завершённый характер, как в научном плане, так и в оформлении. В автореферате приведена информация об апробации работы на четырех конференциях, а также список из четырех статей в рецензируемых журналах, опубликованных в по теме работы (в трех из них Мамонтова А.В. занимает в списке авторов первое место).

Основные результаты работы

Первая часть работы посвящена поиску способов увеличения фотостабильности зеленых флуоресцирующих белков за счет изменений условия культивирования клеток (изменения в составе культуральных сред или добавление рутина). Показано, что рутин в концентрации 20 мг/л увеличивает фотостабильность EGFP и mEmerald, но не влияет на фотостабильность целого ряда других зеленых флуоресцирующих белков. В работе подобраны условия для работы с этим агентом. Также проведено сравнение нескольких распространенных культуральных сред, что позволило выявить компоненты, наличие/отсутствие которых также оказывает влияние на фотостабильность флуоресцирующих белков. Интересны и важны данные

о влиянии условий культивирования на фотостабильность. Все эти данные имеют важное значение для понимания механизмов фотообесцвечивания флуоресцирующих белков, а также могут найти применение в практической деятельности. Эта часть работы поднимает и новые вопросы, решение которых, конечно же, выходит за рамки диссертации. В диссертации несколько раз упоминается, что действие рутина и других компонентов может быть опосредовано “неким биохимическим процессом в живых клетках”, а не прямым взаимодействием с флуоресцирующими белками. Возникает вопрос, а не могут ли эти изменения также влиять и на протекание тех процессов, которые изучаются с использованием флуоресцирующих белков?

Вторая часть работы посвящена созданию новых белков, обладающих повышенной фотостабильностью. Эта часть работы основывается на результатах молекулярного моделирования переноса электронов в EGFP. Последовательно получен набор мутантных белков, с увеличенной фотостабильностью. Отбор мутантов проводился преимущественно именно по признаку большей фотостабильности (при сохранении приемлемой яркости). В результате, как наиболее перспективный по совокупности яркости и фотостабильности отобран тройной мутант EGFP T65G/Y45M/F165Y, хотя яркость этого мутанта несколько ниже яркости EGFP. Другой мутант (Y145M/F165Y) обладает яркостью и фотостабильностью несколько выше, чем EGFP. Важным результатом этой части работы также является наблюдение о том, что тройной мутант EGFP T65G/Y45M/F165Y характеризовался одновременно высокой яркостью и коротким временем жизни флуоресценции, что позволяет его использовать в качестве метки для FLIM-микроскопии.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

Главная ценность диссертационной работы Мамонтовой А.В. состоит в разработке целого ряда способов увеличения фотостабильности зеленых флуоресцирующих белков. Эти данные позволили авторам сделать вполне обоснованные предположения о механизмах фотообесцвечивания изучаемых

флуоресцирующих белков, что представляет несомненный научный интерес. Причем важность проделанной работы не только в полученных экспериментальных данных, но и в открывающемся спектре возможностей для дальнейших исследований. Также наработанные методы и полученные мутанты могут быть использованы при проведении исследований с использованием флуоресцирующих белков. Таким образом, проделанная работа и сделанные выводы имеют как теоретическую, так и практическую значимость.

Достоверность и обоснованность сделанных выводов

Проделан 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. Выводы диссертационной работы основаны на полученных результатах и корректно сформулированы, содержание автореферата полностью отражает основные результаты и выводы диссертации.

В работе Мамонтовой А.В. не удалось обнаружить существенных недостатков. Можно сделать только отдельные замечания по оформлению диссертации, формату представления данных и некоторым формулировкам. Например, автор диссертации в нескольких местах диссертации не иллюстрирует полученный экспериментальный материал (используется формулировка “данные не показаны”). Такой способ представления результатов работы не является удачным для диссертации, даже если речь идет о второстепенных результатах, которые не влияют на сделанные выводы. Не совсем удачно сформировано Приложение к диссертации, в которое, в частности, включен список сокращений, который был бы уместнее в самом начале диссертации. Не совсем удачны некоторые формулировки выводов. Так вывод 5, хотя и точный по смыслу, может создать неправильное представление о вкладе автора в проведенное исследование. Отмеченные выше недостатки ни в коей мере не снижают общего положительного впечатления от диссертации Мамонтовой А.В.

Заключение

Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы, ее теоретическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Мамонтовой Анастасии Вячеславовны «Увеличение фотостабильности зеленых флуоресцентных белков в живой клетке путем блокирования фотоиндуцированного переноса электронов», представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент

Шеваль Евгений Валерьевич,

старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

МГУ имени М.В. Ломоносова,

доктор биологических наук

Е.Ш.

Е.В. Шеваль

25.01.2019

Контактная информация:

Почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

Телефон: 8(495)939-55-28

E-mail: sheval_e@belozersky.msu.ru

Подпись д.б.н. Е.В. Шевалья

«Удостоверяю»

Ученый секретарь

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

МГУ имени М.В. Ломоносова,

доктор физико-математических наук



З.Г. Фетисова