

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации А.В. Мамонтовой «Увеличение фотостабильности зеленых флуоресцентных белков в живой клетке путем блокирования фотоиндуцированного переноса электрона», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Последние годы ознаменовались широким использованием флуоресцентных белков в самых различных биологических исследованиях. Эти белки или их модифицированные производные используются в качестве сенсоров pH, применяются для отслеживания изменения концентрации ионов кальция, измерения окислительно-восстановительного потенциала, отслеживания изменения концентрации некоторых низкомолекулярных метаболитов, а также для внутриклеточной локализации различных белков-мишеней. Несмотря на широкое использование флуоресцентных белков, многие важные проблемы, связанные с использованием этого метода, остаются мало изученными. Так, например, до сих пор остается недостаточно изученным процесс фотообесцвечивания («выгорания») флуоресцентных белков, что может создавать существенные проблемы при использовании зеленых флуоресцентных в различных биологических экспериментах. Для эффективного использования этих белков крайне важно понять механизм обесцвечивания, а также получить такие производные флуоресцентных белков, которые были бы более фотостабильными. По этой причине актуальность диссертационной работы А.В.Мамонтовой, посвященной повышению фотостабильности зеленых флуоресцентных белков, не вызывает сомнений.

Работу можно условно разбить на две части. В первой части своего исследования я диссертации попытался охарактеризовать различные внешние факторы, которые могут влиять на фото обесцвечивание зеленых флуоресцентных белков. Во второй части работы были проведены подробные исследования того, каким образом можно изменить структуру зеленого флуоресцентного белка так, чтобы сделать этот белок более стабильным к обесцвечиванию.

В начале своей работы А.В. Мамонтова показала, что растительный полифенол рутин способен в определенных условиях существенно повышать фотостабильность зеленого флуоресцентного белка. При этом оказалось, что эффективность рутина сильно зависит от состава среды культивирования. Более того, оказалось, что рутин оказывает существенный стабилизирующий эффект только в случае EGFP, но практически не влияет на фотостабильность других зеленых флуоресцентных белков таких как CopGreen, copGreen2, TagGFP2 или Emerald. В ходе проведенного исследования была проведена подробная характеристика различных компонентов широко используемых сред для культивирования, и было обнаружено, что добавление к среде DMEM соединений с антиоксидантной активностью (цианкобаламина, липоевой кислоты, гипоксантина и тимидина) существенно увеличивает фотостабильность зеленого флуоресцентного белка.

Наконец, в первой части исследования было установлено, что процесс обесцвечивания зеленого флуоресцентного белка зависит от условий роста клеток, таких как плотность клеток, концентрация сыворотки, pH, а также наличие или отсутствие различных соединений, участвующих в окислительно-восстановительных процессах. Выполненные исследования являются важным методическим подспорьем для всех исследователей, использующих в своей работе зеленый флуоресцентный белок, и предлагает важные рекомендации для предотвращения процесса фото обесцвечивания этого белка.

Как следует из первой части проведенной работы, обесцвечивание зависит от огромного количества различных факторов и поэтому его оказывается трудно контролировать. По этой причине вполне логичным представляется желание получить модифицированную форму зеленого флуоресцентного белка, которая была бы более устойчивой к обесцвечиванию. Анализ данных литературы и изучение структуры зеленого флуоресцентного белка позволили диссертанту предположить, что процессе фотообесцвечивания могут участвовать аминокислотные остатки, способные акцептировать электрон, образующийся при возбуждении флуорофора светом. Анализ структуры белка позволил высказать предположение, что таким акцептором электронов, участвующим в фото обесцвечивании может быть Tyr145. А.В.Мамонтова получила два мутанта, в которых Tyr145 был заменен на лейцин или фенилаланин, и показала, что точечная мутация Y145L действительно заметно повышает фотостабильность зеленого флуоресцентного белка. К сожалению, оказалось, что, хотя точечная мутация y145L и приводила к существенному увеличению фотостабильности, но одновременно с этим замена тирозина на лейцин приводила к значительному уменьшению яркости и делала полученный мутант мало пригодным для дальнейшей работы. Для увеличения яркости и предотвращения протонирования хромофора были проведены точечные замены E222G и S205V, и было установлено, что двойная мутация Y145L/E222G позволяет получить белок, обладающий высокой устойчивостью к фотообесцвечиванию и, одновременно с этим, обладающий достаточно яркой флуоресценцией. В продолжении этой части исследований диссертант провел систематическое мутирование остатка Tyr145 и установил, что точечные мутанты Y145M и Y145C отличаются как высокой стабильностью, так и хорошей яркостью. В заключительной части своей работы А.В. Мамонтова провела анализ влияния двух других остатков зеленого флуоресцентного белка (Thr65 и Phe165) на фотостабильность и яркость флуоресценции. В ходе этого исследования было показано, что двойной мутант T65G/Y145M обладает исключительно высокой фотостабильностью, но сравнительно низкой яркостью. В тоже время тройной T65G/Y145M/F165Y обладает как высокой фотостабильностью, так и яркостью флуоресценции. Кроме того, короткое время жизни флуоресценции этого мутанта (820 пкс) позволяет использовать этот мутант в качестве метки для FLIM-микроскопии.

Завершая анализ диссертационной работы А.В.Мамонтовой, можно заключить, что это исследование посвящено актуальной проблеме, выполнено на высоком методическом уровне и содержит интересные и важные результаты, а также, что диссертационная работа А.В.Мамонтовой «Увеличение фотостабильности зеленых флуоресцентных белков в живой клетке путем блокирования фотоиндуцированного переноса электрона» является оригинальным, законченным и ценным научным трудом и

соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением 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), а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Доктор биологических наук профессор, член-корреспондент РАН,  
зав. кафедрой биохимии биологического факультета  
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Гусев Николай Борисович

Подпись д.б.н., проф., чл.-корр. РАН Гусева Николая Борисовича заверяю

Ученый секретарь.....



Елена Вячеславовна Петрова

Россия, 117234, Москва Ленинские горы дом 1 стр. 12  
Телефон: +7 (495) 939-2747  
e-mail: NBGusev@mail.ru