



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2

Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32

www.fbras.ru, info@fbras.ru

15.01.2018 № 85-01-19/79
На № 209-217.1-62 от 20.11.2018

УТВЕРЖДАЮ

Директор
Федерального
исследовательского центра
«Фундаментальные основы
биотехнологии»
Российской академии наук
Чл.-корр. РАН, профессор
Попов Владимир Олегович



2019 г.

ОТЗЫВ

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

С момента клонирования в 90-х годах зеленого флуоресцентного белка белки семейства GFP стали одним из важнейших инструментов визуализации. Использование белковых маркёров такого рода стало классическим подходом при изучении активности промоторов, подвижности клеток, органелл, отдельных белков. На основе флуоресцентных белков создаются сенсоры, реагирующие изменение pH, потенциала мембраны, концентрации определенных молекул. Несмотря на очевидные преимущества (хромофор образован собственными аминокислотами, широкая палитра цветов, яркость, скорость созревания) у белков семейства GFP также

существует ряд недостатков, одним из которых является фотообесцвечивание. Про его механизмы известно не так много, достоверно можно сказать только, что в основе лежат обратимые/необратимые нарушения структуры хромофора. Однако для зеленых флуоресцентных белков характерно такое явление как окислительная фотоконверсия: возбужденный хромофор способен служить донором электронов в присутствии определенных акцепторов, переходя в красную форму. Окислительная фотоконверсия является основной причиной фотообесцвечивания зеленых флуоресцентных белков в живых клетках. Детальное понимание механизмов этого процесса, участие в нем аминокислот белка и разработка методов борьбы с окислительной фотоконверсией является важной теоретической и экспериментальной задачей, которой и посвящена данная диссертационная работа.

Диссертация Мамонтовой А.В построена в соответствии с общепринятыми принципами. Она состоит из Введения, Обзора литературы, Целей и задач, Материалов и методов, Результатов и обсуждения, Выводов и Списка литературы.

В обзоре литературы автор подробно останавливается на истории открытия GFP и эволюции представлений о его структуре и биохимических свойствах. Освещены известные на данный момент механизмы фотообесцвечивания флуоресцентных белков, особое внимание уделено окислительной фотоконверсии. Отдельный большой раздел литературного обзора посвящен методам увеличения фотостабильности флуоресцентных белков. В целом, литературный обзор написан понятным языком и хорошо подготавливает читателя к восприятию следующих разделов.

Раздел «Материалы и методы» содержит достаточно подробное и ёмкое описание методической базы, на которую опирается работа. Помимо стандартных методов биохимии, молекулярной и клеточной биологии, также кратко описаны принципы молекулярного моделирования и квантово-химических расчетов.

Собственно, содержательная часть работы представлена в разделе «Результаты и обсуждение». Автор разделил работу на два блока. В первом блоке описываются подходы по увеличению фотостабильности EGFP путем модификации внешних условий, а именно изменением состава клеточной среды. Так, автор продолжил исследование влияния растительного флавоноида рутина, а именно установил концентрационную зависимость эффекта рутина на фотостабильность, а также предложил наиболее оптимальные условия хранения рутина в растворе. Помимо этого, А.В. Мамонтова показала, что рутин, однако, не является универсальным средством для увеличения фотостабильности, поскольку действует только на EGFP, а на фотостабильность таких белков как TagGFP2, CopGreen, CopGreen2 и Emerald рутин не оказывает влияния. Далее при тестировании рутина в различных общеупотребимых средах автор показал, что среда F12 сама по себе увеличивает фотостабильность EGFP. А.В. Мамонтова детально изучила различия в составах сред и протестировала широкий спектр веществ, входящих в состав F12, и показала, что ряд веществ (тимидин, гипоксантин, цианокобаламин и липоевая кислота в составе единой смеси, а также ионы Fe^{2+}) оказывают положительное влияние на фотостабильность. В ходе исследования А.В. Мамонтова изучила влияние и таких внешних условий, как pH среды, плотность роста клеток и концентрация сыворотки, и оказалось, что при повышении плотности роста клеток и концентрации сыворотки растет и фотостабильность. Полученные результаты могут служить методической опорой для многих исследователей, работающих с флуоресцентными белками на живых клетках.

Второй блок работы посвящен изучению влияния изменений в структуре самого белка EGFP. Молекулярное моделирование и квантово-химические расчеты, проведенные совместно с лабораторией профессора Анны Крыловой (Университет Южной Калифорнии, США), определили критические аминокислотные остатки в боковых цепях EGFP, являющиеся потенциальными акцепторами электрона. Наиболее вероятный акцептор,

Tyr145, заменили на Leu, и, действительно, данный мутант характеризовался существенно повышенной фотостабильностью, тем не менее, его значительным недостатком стало снижение абсолютной спектральной чувствительности за счет смещения равновесия хромофора в сторону нейтральной формы. Для борьбы с протонированием хромофора автор ввел дополнительные замены по положениям 205 и 222 и получил яркий и одновременно фотостабильный мутант Y145L/E222G. Далее А. В. Мамонтова продолжила поиск наиболее оптимальной замены по положению 145, проведя насыщающий мутагенез, а также изучила влияние замен в других положениях (65 и 165). Ряд полученных мутантов (Y145C, Y145M, F165Y и T65G) характеризовался как высокой абсолютной спектральной чувствительностью, так и повышенной фотостабильностью. Комбинирование мутаций по трем положениям привело к получению ряда весьма фотостабильных вариантов (например, T65G/Y145M), а также был получен тройной мутант (T65G/Y145M/F165Y), который помимо яркости, сравнимой с EGFP, и высокой фотостабильности, характеризовался коротким временем жизни флуоресценции (820 пс), что делает его весьма перспективной меткой для микроскопии FLIM.

Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых журналах и представлены в материалах конференций. Работа представляет собой законченное научное исследование 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 Анастасия Вячеславовна Мамонтова заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Диссертационная работа была заслушана на межлабораторной конференции Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального

исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук (Протокол № 2 от 30 ноября 2018 г.).

Профессор, д.б.н.

Левицкий Д.И.

Заведующий лабораторией структурной биохимии белка
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.

119071 Российская Федерация

Тел.: +7 (495) 952-13-84

E-mail: levitsky@inbi.ras.ru

