

## ОТЗЫВ

на диссертационную работу Анастасии Вячеславовны 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

Световая микроскопия является основным и необходимым инструментом клеточных биологов для исследования живых клеток. В последнее десятилетие наиболее бурное развитие демонстрируют микроскопические методы витального окрашивания с использованием флуоресцентных белков благодаря удобству их применения и возможности генетического таргетинга в отдельные типы клеток, их органелл и компартментов *in situ* и *in vivo*. На основе ограниченного числа природных форм белков семейства GFP была создана широкая гамма мутантов, весьма разнообразных по своим спектральным характеристикам. Однако, несмотря на ряд несомненных преимуществ, флуоресцентные белки не полностью избавлены от недостатка, свойственного также и другим методам витального флуоресцентного окрашивания, – фотообесцвечивания при продолжительной экспозиции. Это часто становится фактором, сокращающим длительность экспериментов и ограничивающим исследования зависимости функциональных сигналов живых клеток от времени. Таким образом, увеличение фотостабильности – одна из ключевых проблем при разработке новых и усовершенствовании известных флуоресцентных белков. Одним из процессов, вносящих наибольший, как описывает автор, вклад в фотостабильность многих представителей семейства зеленых флуоресцентных белков, является окислительная фотоконверсия, "реддинг". Под действием возбуждающего света зеленые флуоресцентные белки служат фотоиндуцируемыми донорами электронов в фотохимических реакциях с различными акцепторами

электронов. Автор предполагает, что снижение эффекта реддинга повысит фотостабильность зеленых флуоресцентных белков.

Диссертация А.В. Мамонтовой изложена на 101 странице и построена по классической схеме. Она состоит из краткого введения, литературного обзора (19 страниц), формулировки целей и задач, экспериментальной части, результатов и их обсуждения (42 страницы), выводов, приложений и списка цитируемой литературы, содержащего 94 ссылки.

Литературный обзор разделён на пять частей. Первая из них посвящена истории открытия семейства GFP-подобных белков. Вторая часть посвящена их основным свойствам, структурным особенностям и современному значению в науке. Во третьей части обзора автор акцентирует внимание на возможных механизмах фотообесцвечивания флуоресцентных белков. Четвертая глава литературного обзора содержит подробное описание окислительной фотоконверсии, ее механизма и участия в фотообесцвечивании. И, наконец, пятая часть литературного обзора излагает существующие на данный момент методы борьбы с фотообесцвечиванием. В целом, анализ классических и современных работ в обзоре литературы построен логично, написан понятным языком и обладает хорошей степенью информативности для широкого круга исследователей. Материалы из обзора по флуоресцентным белкам вполне могли бы быть использованы в ВУЗах в специальных курсах по основам микроскопии.

Описание экспериментальной части выполнено подробно и содержит в себе широкий спектр методов: от биохимических и молекулярно-биологических до методов микроскопии и вычислительного анализа.

Работу можно разделить на две части, согласно предлагаемым автором подходам по увеличению фотостабильности путем блокирования фотоконверсии: устранение внешних акцепторов электронов путем модификации клеточной среды и устранение внутренних акцепторов электронов путем сайт-направленного мутагенеза боковых цепей eGFP после

предварительных квантово-химических расчетов, так называемый метод рационального дизайна.

В первой части работы А.В. Мамонтова подобрала оптимальные условия хранения растительного флавоноида рутина в качестве добавки, повышающей фотостабильность, установила концентрационную зависимость эффекта рутина и протестировала его в различных клеточных средах и на различных зеленых флуоресцентных белках. В ходе экспериментов автор обнаружила, что среда F12, в которой рутин не действует, оказывает положительный эффект на фотостабильность EGFP. А.В. Мамонтова протестировала 16 веществ, которые содержатся в F12 и не содержатся в DMEM, и определила, что  $\text{FeSO}_4$ , а также композит, состоящий из тимидина, гипоксантина, B12 и липоевой кислоты, увеличивают фотостабильность EGFP в живых клетках. Также автор определила, в каких условиях культивации клеток фотостабильность является наивысшей: при концентрации фетальной сыворотки 20% и максимальной плотности роста клеток, что может быть полезным для других исследователей, чья работа связана с визуализацией структур в живых клетках.

Вторая часть работы посвящена перспективной методике увеличения фотостабильности флуоресцентных белков, основанной на методе рационального дизайна: были проведены квантово-химические расчеты, определившие критические аминокислотные остатки в боковых цепях EGFP, служащие промежуточными акцепторами электрона при окислительной фотоконверсии, далее эти аминокислотные остатки были заменены на остатки, которые не могут служить переносчиками электрона. Так, был получен мутант Y145L с увеличенной до 15 раз фотостабильностью, но сниженной яркостью. Для увеличения яркости автор ввела дополнительную замену в положении 222, что привело к созданию яркого и фотостабильного белка. Также автор исследовала влияние замен в хромофорообразующем положении 65 и полученном в ходе расчетов положении 165. Комбинирование перспективных замен привело к созданию ряда ярких и фотостабильных мутантов EGFP, а

также интересного мутанта T65G/Y145M/F165Y, который является уникальным в своем роде: он характеризовался не только повышенной яркостью и флуксуостабильностью, но и укороченным временем жизни флуоресценции, ~820 пс. Выше описанные свойства делают его весьма удачной меткой для микроскопической визуализации времени жизни флуоресценции (FLIM).

Диссертация А. В. Мамонтовой является актуальным и зрелым научным исследованием, представляет несомненный интерес для соответствующих специалистов 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.

Результаты работы могут найти применение в исследовательских лабораториях научных учреждений. Рассматриваемая работа является добротным научным исследованием, выполненным на современном уровне. Текст диссертации написан понятным, грамотным языком и хорошо проиллюстрирован. Автореферат в полной мере отражает результаты работы.

#### Замечания.

Существенных замечаний по работе нет, имеется лишь несколько вопросов общего и уточняющего характера.

1) Рис. 3 (автореферат), рис. 12, 15 (диссертация) – длительность измерения флуоресценции для разных белков разная т.к. измерения проводились до достижения полувыцветания. Можно ли было получить дополнительные данные, проводя измерения всех белков с максимальной длительностью, и могли бы эти недополученные данные играть какую-нибудь роль при данной

постановке задачи? Почему эксперименты, представленные на рис. 23 и 27, проводились дольше, т.е. до более низких, чем 50%, значений выцветания?

2) Как Вы считаете, возможно ли в перспективе кардинально решить проблему выцветания флуоресцентных белков, совершенствуя их дизайн? Или же возможные улучшения могут носить только градуальный характер, а для получения флуоресцентных меток, полностью устойчивых к фотообесцвечиванию, потребуются новые технологии?

3) Представление данных в столбиковых диаграммах во многих случаях можно было бы улучшить, добавив разброс оригинальных данных, что сейчас становится фактическим требованием во все большем числе международных журналов.

В диссертации присутствуют незначительные недочеты по стилистике изложения, которые, однако, не умаляют высокого качества проделанной работы. Употребление жаргонизмов (например, «двухфотонный лазер») носит отдельный единичный характер, и может рассматриваться, скорее, как описка, поскольку не повторяется по тексту.

Никитин Евгений Сергеевич,  
д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории  
клеточной нейробиологии обучения  
Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии  
Российской Академии Наук,  
ул. Бутлерова, 5А, Москва, 117485  
Тел. +7 (926) 3772707. E-mail: jeniank@mail.ru

Подпись д.б.н. Никитина Е.С. 31.01.19

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИВНД РАН

к.б.н. Пасикова Н.В.

