



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

119991, ГСП-1, г.Москва В-334, ул. Вавилова, 32. Для телеграмм: Москва В-334, ИМБ РАН.; л/с 06319001290 в ОФК по ЮЗАО г.Москвы, т.сч. 40503810300001009007, в Отделении №1 Московского ГТУ Банка России г.Москва 705, БИК 044583001, ИНН. БАНКА 7724189956 ОКПО – 02699501, ОКОНХ - 95110 тел. 135-23-11. 135-11-60; факс 135-14-05

№ 12312-2171

а. № _____

Утверждаю

Зам. директора ИМБ РАН

Д.б.н., проф. В.Л. Карпов



Отзыв ведущей организации

о диссертационной работе Карена Сергеевича Саркисяна
«Флуоресцентные белки с анионным хромофором на основе триптофана»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности молекулярная биология – 03.01.03.

Флуоресцентные белки широко используются в биологических исследованиях в качестве флуоресцентных меток, позволяющих проводить неинвазивную визуализацию биологических структур и процессов. Созданная на сегодняшний день палитра флуоресцентных белков решила многие актуальные задачи прижизненной микроскопии, но, в то же время, для многих методов микроскопии требуется дальнейшая разработка и оптимизация флуоресцентных белков.

В диссертации К.С. Саркисяна описывается разработка нового класса флуоресцентных белков, содержащих хромофор на основе триптофана в анионном состоянии. Анионное состояние триптофанового хромофора флуоресцентных белков не было известно, несмотря на широкое использование в микроскопии циановых флуоресцентных белков с триптофановыми хромофорами. В диссертационной работе К.С. Саркисяну не только удалось показать возможность существования хромофора в анионном состоянии, но также создать флуоресцентные белки WasCFP и NowGFP, обладающие уникальными биофизическими свойствами и расширяющими временной предел для флуоресцентной микроскопии. Научная новизна и актуальность работы не вызывает сомнений.

Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Материал диссертации изложен на 85 страницах и хорошо иллюстрирован (36 рисунков и 1 таблица). Во введении кратко сформулированы предпосылки и задачи работы.

Обзор литературы составляют два больших раздела, в которых обсуждаются литературные данные, непосредственно связанные с темой работы. В первом рассматриваются данные о величинах pK_a боковых цепей аминокислот в белках и влиянии белкового окружения на их ионизацию. В частности, затрагиваются такие важные в контексте работы темы, как изменения pK_a ионизируемых химических групп, входящих в состав боковых цепей аминокислот, эффекты погружения остатков лизина и аргинина внутрь белковой глобулы. Кроме того, в первой части обсуждается возможность ионизации остатка триптофана в нативном белке и описанные состояния индольного фрагмента триптофана в биологических системах.

Во втором разделе приводятся данные о структуре флуоресцентных белков и взаимодействиях между хромофором и аминокислотным окружением. В нем кратко освещена история разработки флуоресцентных белков, подробно рассмотрены вторичная и третичная структуры типичного флуоресцентного белка, механизмы формирования и разнообразие формируемых хромофоров, а также рассмотрены взаимодействия хромофора с окружающими аминокислотами.

Раздел «Материалы и методы» подробно описывает ход экспериментов, выполненных диссертантом. В нем подробно описаны материалы и методы исследования, в том числе имеются прописи использованных некоммерческих растворов. Описания экспериментов достаточно полны для их воспроизведения.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из нескольких частей. В первой части автор достаточно подробно описывает пройденный экспериментальный путь от планирования исследования до получения первого белка с анионным хромофором на основе триптофана – WasCFP. В ней также подробно рассматриваются спектральные свойства WasCFP. Этот белок является мутантной формой «родительского» белка mCerulean. Основой для конструирования мутантных форм была пространственная структура белка mCerulean с высоким разрешением. Белок WasCFP был отобран из очень большого количества мутантных форм, полученных методами направленного и случайного мутагенеза, в результате исследования их флуоресцентных свойств. Он обладает длинноволновым пиком спектра флуоресценции и временем жизни флуоресценции 5.1 нс, что значительно превышает этот критерий для зеленых флуоресцентных белков. В этой части диссертации автором выполнен очень большой объем экспериментальной работы. Заслуживает внимания разработанная К.С. Саркисяном оптимизация протокола

проведения метода направленного мутагенеза по методике самособирающегося клонирования (стр. 26-32), позволившая значительно быстрее получать мутантные формы.

Следующая часть работы посвящена интерпретации полученных биохимических и фотофизических свойств WasCFP. К.С. Саркисян подробно останавливается на обсуждении вопроса о природе новой спектральной формы, обнаруженной в мутантных белках mCerulean и корректности ее интерпретации как формы, соответствующей белку, содержащему анион триптофана.

Поскольку белок WasCFP обладал длительным временем жизни флуоресценции, но имел не совсем удовлетворительные другие флуоресцентные параметры, далее К.С. Саркисов, используя для отбора колоний случайного мутагенеза белок WasCFP зеленую флуоресценцию при повышенной температуре, получил белок NowGFP, содержащий стабильную анионную форму триптофана. Флуоресцентные свойства этого белка были подробно изучены. При продолжительном облучении синим светом обнаружено фотопереклечение белка из зеленой в голубую флуоресценцию, что является нетривиальным для флуоресцентных белков. Суммируя все флуоресцентные характеристики, полученные для этого белка, К.С. Саркисян предложил структурное объяснение феномена фотопереклечения. Оно предполагает переход из состояния с анионным хромофором в протонированную форму как результат изомеризации при облучении синим светом и далее необратимую изомеризацию, приводящую к нейтральному хромофору. Выполнение этой части работы также потребовало большого объема экспериментов.

Замечательно, что в результате рентгеноструктурного анализа кристаллов белка NowGFP, полученных в кислых, щелочных условиях и после облучения синим светом, предложенное объяснение было подтверждено.

В последней части диссертации показана возможность практического использования NowGFP. Диссертант описывает результаты применения NowGFP в классической флуоресцентной микроскопии и в микроскопии времени жизни флуоресценции, а также представляет результаты совместной с коллегами работы по использованию NowGFP в качестве донора энергии в сенсорах, основанных на ферстеровском резонансном переносе энергии.

В целом, диссертационная работа К.С. Саркисяна выполнена на самом современном экспериментальном уровне, результаты являются приоритетными. Работа свидетельствует о высоком теоретическом потенциале соискателя. Она написана хорошим языком, практически не содержит опечаток. Все части работы хорошо и полно изложены. Рисунки достаточно просты в понимании и хорошо иллюстрируют текст.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Результаты работы были опубликованы в четырех рецензируемых зарубежных научных журналах, доложены на российской и международных конференциях.

Несмотря на несомненные достоинства работы, она не лишена недочетов:

1. В работе слишком кратко описаны результаты как кристаллографического исследования, так и применения NowGFP в качестве донора энергии во FRET-FLIM сенсорах. Подробное изложение указанных результатов усилило бы текст диссертации.


2. В оглавлении не указано наличие списка цитируемой литературы.

3. В работе имеется минимальное количество англицизмов. Однако использование терминов «мутант» и «мутация» вместо «мутантная форма, мутантный белок» и «замена» в контексте диссертации представляется неправильным.

Названные недочеты не умаляют достоинств работы и не снижают общего положительного впечатления.

Диссертационная работа Саркисяна Карена Сергеевича «Флуоресцентные белки с анионным хромофором на основе триптофана» соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории химических основ биокатализа ИМБ РАН, протокол № 16 от 20 октября 2015 года.

Заведующая Лабораторией
химических основ биокатализа
Федерального государственного
Бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии им.
В.А. Энгельгардта Российской академии наук
д. х. н., проф.  (Т.В. Демидкина)

Контактная информация:

Почтовый адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. ИМБ РАН

E-mail: isinfo@eimb.ru