

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М.
ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ
РАН) ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 16 декабря 2015 г. № 21

О присуждении Саркисяну Карену Сергеевичу, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Саркисяна Карена Сергеевича «Флуоресцентные белки с анионным хромофором на основе триптофана» по специальности 03.01.03 (молекулярная биология) принята к защите 30 сентября 2015 года, протокол № 13, диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15 февраля 2013 года).

Соискатель Саркисян Карен Сергеевич, 1989 года рождения, в 2011 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», по специальности «биохимия». В 2014 г. окончил аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время работает старшим лаборантом в лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель – **Лукьянов Константин Анатольевич**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биофотоники Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. **Соболев Александр Сергеевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена Российской академии наук заслуженный деятель науки РФ;
2. **Мельник Богдан Степанович**, кандидат физико-математических наук, руководитель группы спектроскопии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук

дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), г. Москва, (заключение составила Демидкина Татьяна Викторовна, доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией химических основ биокатализа, утвердил – заместитель директора ИМБ РАН д.б.н. профессор Карпов В.Л.) – указала, что диссертационная работа Саркисяна К.С. соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. №842. Автор работы, Саркисян Карен Сергеевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 (молекулярная биология).

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит следующие замечания:
 - 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 используемой 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.
2. Отзыв официального оппонента д.б.н. Соболева А.С., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- 1) Автором получены и охарактеризованы два белка: WasCFP и NowCFP. Им обоим уделен примерно одинаковый объем текста. Однако, остается непонятным взгляд автора на целесообразность использования каждого из них: 1) если WasCFP не более чем исходный белок для получения NowCFP, то зачем уделять столь большое внимание его характеристикам; 2) если, по мнению автора, у него есть определенные преимущества перед NowCFP, то почему бы об этом не написать?
 - 2) В главе «Фотопереключения NowCFP» сделан вывод о том, что «... восстановления анионного состояния хромофора из состояния 3 не происходит, так как аминокислотное окружение было необратимо изменено при фотоконверсии» [автореферат: стр. 15-16; диссертация: стр. 61]. Однако для такого однозначного утверждения в этой и предшествующих главах автором не приводятся столь же однозначно трактуемые экспериментальные данные. Возможно, автор имел в виду масс-спектроскопические исследования, описываемые далее в тексте? Если так, то тогда этому утверждению место там, но при условии, что оно аккуратно обосновано.
 - 3) В разделе “Материалы и методы исследования” отсутствуют описания методик, использованных для кристаллографических исследований и масс-спектрометрии. Описание методов флуоресцентной микроскопии сведено к простому перечню использованных микроскопических систем, а также к упоминанию того, как рассматривали трансфицированные клетки и библиотеки мутантов, как будто этим и ограничивалось использование автором микроскопии.
 - 4) Подписи на осях рисунков и надписи на самих рисунках приводятся то на русском языке, то на английском.
 - 5) Непонятно, почему раздел 3 “Материалы и методы исследования” начинается с подраздела 3.0.9?
 - 6) Один и тот же процесс называется то "фолдингом", то "сворачиванием". Есть даже удивительный термин "сфолдировавшийся" [диссертация: стр. 17]; такого же рода термин "вытитровывание" [диссертация: стр. 51].
 - 7) Своеобразен и взгляд автора на значение раздела “Заключение”. Напрасно читатель ждал бы в нем какое-либо резюме: К.С. Саркисян поместил туда сведения о том, что на тему его работы появилось в литературе с момента окончания его экспериментальной деятельности.
3. Отзыв официального оппонента к.ф.-м.н. Мельника Богдана Степановича, отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- 1) В диссертации отмечено, что наряду с ключевой аминокислотной заменой L207Q, свдвинувшей равновесие в пользу анионной формы хромофора в WasCFP, в результате случайного мутагенеза были отобраны и другие замены, также увеличивающие долю анионной формы, причем некоторые из них встречались неоднократно. На мой взгляд было бы интересно создать мутантный белок, содержащий одновременно все обнаруженные улучшающие замены. Возможно, анионная форма в таком белке была бы еще стабильнее, а белок был бы менее чувствителен к изменениям окружающей среды по сравнению с WasCFP и NowGFP.
- 2) На мой взгляд, в диссертации недостаточно внимания уделено обсуждению вопроса о фотостабильности NowGFP. Автор приводит убедительные доказательства практической полезности NowGFP для микроскопии, однако фотоконверсии, которым подвержен белок, ставят под сомнение вопрос о применимости NowGFP для продолжительных экспериментов, связанных с облучением светом высокой интенсивности.
- 3) Описывая мутагенез белка WasCFP, автор приводит ряд спектральных данных мутантов, однако подробно не описывает их свойств и различий между мутантами. В частности, из приведенных на рисунке 4.14 спектров поглощения неясно, как именно был отобран “мутант 1”, спектры поглощения которого незначительно отличаются от спектров WasCFP.
- 4) На мой взгляд, было бы интересно подтвердить анионное состояние триптофана с помощью ядерного магнитного резонанса, как по N1, так и по N15, проследив за потерей протона индольным фрагментом хромофора при различных pH. Это могло бы стать окончательным прямым подтверждением того, что хромофор действительно находится в анионном состоянии.
- 5) В диссертации присутствует ряд опечаток и неточностей. Например, ряд рисунков, на которых изображены различные спектры, озаглавлены “Направленная эволюция ...”. Очевидно, что более уместными были бы названия, описывающие то, что изображено на рисунке, а не то, какие выводы из этого сделали.

Соискатель имеет 6 опубликованных работ, из них по теме диссертации 4 публикации объемом 2 печатных листа в зарубежных научных изданиях, включенных в научную базу цитирования Web of Science. Диссертационная работа представлена на российских и международных конференциях и симпозиумах. Научные работы по теме диссертации, в которые автор внёс основной или существенный вклад:

1. Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Sarkisyan K.S., Mishin A.S., Lukyanov K.A., Goryacheva E.A., Ziganshin R.H., Dauter Z., Pletnev S. Structure of the green fluorescent protein NowGFP with an anionic tryptophan-based chromophore. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2015 71:1699-1707.
2. Sarkisyan K.S., Goryashchenko A.S., Lidsky P.V., Gorbachev D.A., Bozhanova N.G., Gorokhovatsky A.Y., Pereverzeva A.R., Ryumina A.P., Zherdeva V.V., Savitsky A.P., Solntsev K.M., Bommarius A.S., Sharonov G.V., Lindquist J.R., Drobizhev M., Hughes T.E., Rebane A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Green fluorescent protein with anionic tryptophan-based chromophore and long fluorescence lifetime. *Biophys. J.* 2015 109(2):380-9
3. George Abraham B., Sarkisyan K.S., Mishin A.S., Santala V., Tkachenko N.V., Karp M. Fluorescent Protein Based FRET Pairs with Improved Dynamic Range for Fluorescence Lifetime Measurements. *PLoS One.* 2015 10(8):e0134436
4. Sarkisyan K.S., Yampolsky I.V., Solntsev K.M., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Tryptophan-based chromophore in fluorescent proteins can be anionic. *Sci. Rep.* 2012 2:608

Диссертационный совет отмечает, что соискателем разработана новая группа флуоресцентных белков, несущих триптофановый хромофор в заряженном состоянии и показана перспективность практического использования этих белков для микроскопии, а также в качестве основы для разработки генетически кодируемых сенсоров.

К теоретической значимости работы относится установление возможности достижения в биологической системе ионизованного состояния индольного фрагмента триптофана, ранее считавшегося неионизируемым при физиологических условиях. Возможность существования остатка триптофана в анионном состоянии следует учитывать при интерпретации свойств флуоресцентных белков с триптофановыми хромофорами, а также, возможно, при интерпретации свойств белков, содержащих остатки триптофана, из других белковых семейств. Кроме того, диссертантом предложена структурная модель, объясняющая полученные в работе экспериментальные данные.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается демонстрацией применимости разработанных белков для микроскопии времени жизни флуоресценции, а также для разработки генетически кодируемых сенсоров с улучшенными характеристиками. Практическая полезность разработанных флуоресцентных белков основывается на необычно долгом времени жизни флуоресценции. Кроме того, диссертантом обнаружена высокая фотохимическая активность триптофанового хромофора в анионном состоянии, что может быть потенциально

использовано для создания фотопереключаемых флуоресцентных меток или оптогенетических инструментов.

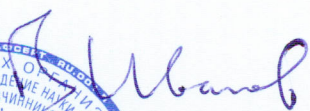
Оценка достоверности результатов основывается на том, что они получены с использованием отработанных методов исследований, кроме того, полученные различными методами результаты согласуются между собой и с предложенной в диссертации теоретической моделью.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и постановке экспериментов. Основные результаты работы были получены лично автором, за исключением анализа данных кристаллографии (Лаборатория рентгеноструктурного анализа, ИБХ РАН), создания трансгенных животных (Лидский П.В., ИБГ РАН), создания стабильной линии клеток HeLa (Рюмина А.П., ИБХ РАН) и создания генетически кодируемых сенсоров (Bobin George Abraham, Tampere University of Technology, Финляндия). Автор также лично участвовал в подготовке публикаций по выполненной работе.


На заседании 16 декабря 2015 г. диссертационный совет принял решение присудить Саркисяну К.С. ученую степень кандидата биологических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 7 докторов наук (по специальности 03.01.03 - молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за -23, против -0, недействительных бюллетеней -0.

Председатель
диссертационного совета
Академик РАН




Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н.


Олейников Владимир Александрович