

## **Отзыв официального оппонента**

на диссертационную работу Саркисяна Карена Сергеевича  
«Флуоресцентные белки с анионным хромофором на  
основе триптофана», представленную на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

### Актуальность работы

Диссертационное исследование К.С. Саркисяна выполнено в области белковой инженерии, биофизики и биохимии флуоресцентных белков. Его целью явилось изучение возможности создания нового состояния триптофанового хромофора в циановых флуоресцентных белках.

Изучение флуоресцентных белков и их оптимизация для применения в биологических исследованиях продолжается уже более двух десятилетий, и за это время были разработаны сотни флуоресцентных белков с различными свойствами. Основные типы хромофоров, - ароматических структур, от которых в наибольшей степени зависят спектральные свойства флуоресцентного белка, - хорошо изучены и охарактеризованы.

В настоящее время основными направлениями в области разработки флуоресцентных белков являются их оптимизация под конкретные методики микроскопии, разработка генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков, разработка дальнекрасных флуоресцентных белков, а также создание фотоуправляемых белков для использования в качестве оптогенетических инструментов. В области фундаментальных исследований остаются нерешенными многочисленные вопросы, связанные с фотофизическими и фотохимическими процессами,

происходящими при поглощении света, а также эволюционная история флуоресцентных белков и их роль в биологических системах.

Работа К.С. Саркисяна вносит вклад в несколько из перечисленных направлений.

Основные полученные в работе результаты:

С фундаментальной точки зрения, в работе удалось впервые достичь неопisanного в биологических системах ионизованного состояния индольного фрагмента триптофана, пусть и в составе более протяженной ароматической структуры. Анионное состояние хромофора было достигнуто в одном из хорошо изученных и широко используемых флуоресцентных белков - циановой белке mCerulean. Мутагенез mCerulean проводился многими группами и до работы диссертанта, однако ионизованное состояние хромофора не только не было достигнуто экспериментально, но и не обсуждалось в литературе, как возможное.

Помимо нового спектрального состояния хромофора, в разработанных К.С. Саркисяном белках был обнаружен не описанный ранее тип фотоконверсии, сопровождающийся изменением флуоресценции с зеленой на голубую. Полученные экспериментальные данные обобщены диссертантом в теоретическую модель, описывающую наблюдаемые явления, и подтверждены данными кристаллографии.

Полученные диссертантом белки оказались перспективны и для практического применения. Достигнутое в белке WasCFP и стабилизированное в белке NowGFP новое состояние триптофанового хромофора обладает необычными биофизическими свойствами, в первую очередь, рекордно долгим для флуоресцентных белков временем жизни флуоресценции в 5,1 нс, более, чем в два раза превосходя время жизни флуоресценции большинства зеленых флуоресцентных белков. В

диссертации продемонстрировано, что благодаря этому NowGFP является крайне интересной меткой как для микроскопии времени жизни флуоресценции, так и для разработки на его основе так называемых FRET-FLIM-сенсоров.

В работе показано, что NowGFP открывает новый временной канал для микроскопии времени жизни флуоресценции, обеспечивая возможность одновременной визуализации с другими зелеными флуоресцентными белками, а FRET-пары на основе NowGFP обладают широким динамическим диапазоном и наибольшим ферстеровским радиусом среди описанных к настоящему времени пар флуоресцентных белков.

#### Список замечаний по диссертации и автореферату

У меня есть несколько вопросов по диссертационной работе:

- ~ 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?
- ~ 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.

Теперь о замечаниях. Они связаны исключительно с подачей и оформлением работы.

- ~ 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.
- ~ Подписи на осях рисунков и надписи на самих рисунках приводятся то на русском языке, то на английском.
- ~ Непонятно, почему раздел 3 “Материалы и методы исследования” начинается с подраздела 3.0.9?
- ~ 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].
- ~ 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.

Эти замечания не затрагивают содержание и суть работы К.С. Саркисяна, которую я оцениваю очень высоко.

Новизна и обоснованность полученных результатов

Представленные в диссертационной работе данные являются новыми научными данными. Они были получены и проанализированы современными методами, корректно описаны, хорошо и наглядно проиллюстрированы в тексте диссертации, и не вызывают сомнений. Выводы соответствуют полученным результатам.

### Заключение

На основе изучения диссертации и опубликованных работ по теме диссертации я могу заключить, что диссертационная работа К.С. Саркисяна актуальна и является цельным завершённым исследованием, выполненным на современном экспериментальном уровне. Специально хочу отметить превосходное планирование экспериментов, адекватность методов задачам исследования и – что очень важно – полноту разработки: от дизайна (вместе с моделированием) через широкий спектр характеристик получаемых продуктов к их возможным применениям.

Основные научные результаты диссертационной работы получены впервые и опубликованы в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов не вызывает сомнений.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нем правильно отражены основные идеи и выводы диссертации, новизна и практическая значимость результатов исследований.

Все, изложенное выше, позволяет заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения и научной значимости диссертационная работа Саркисяна Карена Сергеевича «Флуоресцентные белки с анионным хромофором на основе триптофана» соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям. Диссертация соответствует требованиям 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 искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Заведующий лабораторией  
молекулярной генетики внутриклеточного транспорта  
Института биологии гена Российской академии наук  
Заслуженный деятель науки РФ  
доктор биологических наук, профессор

Адрес: Москва, 119334, ул. Вавилова 34/5  
Телефон: (499) 135-3100, e-mail: sobolev@igb.ac.ru

Соболев Александр Сергеевич

24 ноября 2015 г.



Подпись *А.С. Соболева*

Заведующий лабораторией  
ученый секретарь ИБГ РАН Мансурова Г.В.