

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН
16 декабря 2015 года

Защита диссертации
на соискание учёной степени кандидата биологических наук
Саркисяном Кареном Сергеевичем
«Флуоресцентные белки с анионным хромофором на основе
триптофана»

по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Москва
2015 г.

СТЕНОГРАММА
заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН
16 декабря 2015 года

Председатель диссертационного совета
академик РАН

В.Т.Иванов

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации –

1. Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
7. Член-корр. РАН	Габиров Александр Габирович	(03.01.06)
8. Член-корр. РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
9. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
10. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
11. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
12. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
13. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
14. Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
15. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
16. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
17. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
18. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
19. Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
20. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
21. Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
22. Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
23. Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

Вадим Тихонович Иванов:

– Ну что, готовы? У меня такое впечатление, что диссертант готов. А зал уже давно готов. Поэтому есть предложение приступить к нашему заседанию. Речь идет о диссертации. Защита Кареном Сергеевичем Саркисяном кандидатской диссертации и Владимир Александрович доложит нам материалы личного дела.

Владимир Александрович Олейников:

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечается, что материалы личного дела и документы предварительной экспертизы соответствуют требованиям Положения ВАК)

Вадим Тихонович Иванов:

– Есть ли вопросы, замечания? Традиционно отсутствуют. Спасибо. Тогда слово Вам, Карен Сергеевич, для доклада. 20 минут.

Карен Сергеевич Саркисян:

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо вам за доклад. Перейдем к обсуждению. Начнем с вопросов. У кого есть вопросы? Николай Владимирович.

Николай Владимирович Бовин:

– Есть ли у вас гипотеза о физической причине долгой флуоресценции этого белка?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Я думаю, что это реально вопрос к квантовым химикам. Я не могу реально сформировать гипотезу. Я заметил, что вообще все белки с хромофором на основе триптофана, они имеют более долгое время жизни флуоресценции, чем, например, белки с хромофором на основе тирозина. Если мы вернемся, вот у меня была табличка. Есть, например, еще один белок с хромофором на основе триптофана. Он тоже обладал как бы рекордным до нашего белка временем жизни флуоресценции, в четыре наносекунды. И циановый белок. А хромофор на основе тирозина, они обычно более короткоживущие. Это, видимо, связано с какими-то как бы, может быть, квантовыми причинами, которых я не понимаю.

Вадим Тихонович Иванов:

– Сейчас, сейчас, сейчас.

Николай Владимирович Бовин:

– Вопрос, вторая половина.

Вадим Тихонович Иванов:

– Давайте дадим Николаю Владимировичу возможность кончить, а потом перейдем к следующему.

Николай Владимирович Бовин:

– Не связано ли, не связаны ли два факта причинно-следственно? Вот это долгое время жизни и, скажем так, химическая нестабильность этого белка?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Я думаю, что может быть да, то есть вполне возможно. Но мы тут попадаем в некоторую ловушку, потому что я как бы приложил некоторые усилия, чтобы попытаться найти мутант, который был бы более фотостабильный. Но, поскольку при фотоконверсии разрушается именно тот самый лизин, который нужен для возникновения анионной формы, то как бы не очень понятно, можно ли действительно создать белок, который был бы одновременно, существовал преимущественно в анионной форме и не подвержен был бы вот этой вот фотохимической реакции. Возможно, мы застabilizировали просто очень неактивное состояние, да, которое высокоэнергетическое уже.

Вадим Тихонович Иванов:

– Так, сейчас Василевский, потом Плетнев.

Александр Александрович Василевский:

– Если позволите, два вопроса. Первый это: как вы объясняете термочувствительность Was и отсутствие такой у Now? И второй познавательный...

Вадим Тихонович Иванов:

– Давайте по очереди. Сначала первый вопрос.

Карен Сергеевич Саркисян:

– Я прошу прощения. Я просто не останавливался на спектральных свойствах NowGFP, потому что они похожи. На самом деле, у NowGFP тоже есть термочувствительность, просто как бы она больше сдвинута на высокие температуры.

Александр Александрович Василевский:

– А как объясняется?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Как объясняется? На самом деле у меня нет хорошего объяснения. Я как бы себе это объясняю на пальцах, что, может быть, поскольку лизин в разных конформациях существует, да, то важно время, среднее время, которое аминокислотная группа лизина проводит в контакте с хромофором. И при нагревании, да, возникает большое количество разных состояний, которые белок может попробовать, и как бы уменьшается среднее время, которое лизин проводит в контакте с хромофором. Или там заселенность какого-то состояния.

Александр Александрович Василевский:

– Второй вопрос познавательный. Где-нибудь еще в белках триптофан диссоциирует?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Вот так чтобы именно ионизация самого триптофана, такого вообще в биологических системах не описано. Во всяком случае мы не нашли. Есть еще фотоионизация, когда...

Александр Александрович Василевский:

– Это понятно.

Карен Сергеевич Саркисян:

– Там чуть-чуть другой процесс, там не возникает анионного состояния ... какое-то, положительно заряженное, по-моему.

Александр Александрович Василевский:

– Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Владимир Захарович, у вас был вопрос.

Владимир Захарович Плетнев:

– Какие перспективы повысить стабильность разрушения триптофана под воздействием, скажем, синего света, который вы наблюдаете? Насколько я знаю, вы получили один мутант, который увеличил стабильность больше, чем в два раза.

Карен Сергеевич Саркисян:

– Да.

Вадим Тихонович Иванов:

– Я не понял. Повторите вопрос, потому что я не уверен, что все слышали.

Карен Сергеевич Саркисян:

Вопрос такой. Какие перспективы повышения фотостабильности белка NowGFP? Потому что Владимир Захарович знает, что есть мутант, у которого стабильность в два раза выше. Перспектива чуть-чуть есть. Я как бы не знаю, можно ли совсем избавиться от фотоконверсии. Но я уверен, что так или иначе можно повлиять чуть-чуть на нее. А структурные основы – это, скорее, к Вам.

Вадим Тихонович Иванов:

– Васьковский.

Васьковский Борис Викторович:

– Вы в докладе упомянули, что использовали метод масс-спектрометрии для доказательства разрушения лизина, правильно?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Да.

Васьковский Борис Викторович:

– Вот. Можете чуть-чуть поподробнее рассказать о этих экспериментах и что там в лизине разрушается?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Сейчас. Значит, мы делали эту работу вместе с Рустамом Зиганшином. И мы сравнивали два образца: NowGFP облученный и необлученный. И, зная по кристаллу, что исчезает оптическая плотность в области боковой цепи, что в целом неожиданно, потому что происходит прямо разрушение C-C-связи, мы хотели это подтвердить с помощью масс-спектрометрии. Использовался, я так понимаю, MS-MS-спектр, и была обнаружена разница, по-моему, в сорок три или сорок один дальтон, который соответствует вот этому фрагменту, который предполагался. И мы сделали вывод, что мы подтвердили это, то, что видим в кристалле.

Вадим Тихонович Иванов:

– Скажите, у вас, в вашей белке NowGFP в шестьдесят первом положении лизин, правильно? А нет ли образца с аргинином в этом положении?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Есть. Он то ли не светится, то ли не ионизуется, я уже не помню.

Вадим Тихонович Иванов:

– И причина непонятна, да?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Видимо, аргинин, он подлиннее, у него там как-то заряд распределен менее локально. Или он просто портит белок.

Из зала:

Стерическое...

Карен Сергеевич Саркисян:

– Или он просто недостаточно локализован, сам заряд, чтобы ионизовать хромофор.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Вопросы есть еще? Да, сейчас. Сначала с задних рядов, потом со средних рядов.

Александр Михайлович Сапожников:

– Сапожников Александр Михайлович. Вот весьма интересный момент температурной зависимости флуоресценции. Белок, получается, вы создали, возможно, уникальный метрический инструмент для измерения локальной температуры в отдельных компартментах клетки. Совершенно уникальная ситуация. Вы не рассматривали эту такую возможность? Или, может быть, уже даже пытались где-то использовать?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Я согласен с вами, да. Мы ее как бы теоретически рассматривали, но практически не пытались использовать. Можно также поскольку флуоресценция циановая и зеленая. Единственная проблема здесь, что у белка я показывал спектр поглощения. Реальный квантовый выход циановой формы, он там в несколько раз ниже, то есть довольно низкий, и поэтому это не очень удобно. Было бы оптимально иметь белок, у которого обе формы одинаково хорошо флуоресцируют, и тогда можно это делать легко. Один вариант – это получить такой белок. Другой вариант – попробовать с этим. В общем, мы не пробовали. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– У вас был вопрос. Прошу.

Дмитрий Александрович Болотин:

– А такой вопрос. Вот вы упомянули микроскопию времени жизни. И это отдельная ось, когда снимаешь изображение – это отдельная ось, никак не связанная с интенсивностью. Поэтому, вероятно, удобно на основе этого делать какие-то сенсоры. Вопрос: зависит ли время жизни от pH, от чего-нибудь? И есть ли перспектива разработки сенсора вот именно времени жизни на основе этого.

Карен Сергеевич Саркисян:

– Да, вот, собственно, я говорил, что... Сейчас. Мы начали с сенсоров на FRET, да. Там как раз по времени от эффективности переноса энергии с донора на акцептор зависит время жизни донора. То есть можно по времени жизни измерять эффективность переноса. Эффективность переноса зависит от расстояния между хромофором. И поэтому если меняется расстояние в ответ на какое-то изменение внешней среды, то можно это регистрировать по времени жизни. В принципе, время жизни также зависит от pH, просто если белок поместить в разные pH... Кстати, у NowGFP оно практически не зависит. Но, в принципе, известно в литературе, что как бы от внешних условий оно может зависеть. Вот у нас, например, в личинке дрозофилы там фиксация глицеролом была у личинки, и время жизни, на самом деле, упало. То есть у NowGFP здесь три с половиной наносекунды, а у EGFP – полторы. Примерно сместилось там на полторы наносекунды в коротковолновую область, в более короткое время жизни.

Вадим Тихонович Иванов:

– Вопросы иссякли? Нет, отнюдь. Мартынов, а потом Долгих.

Владимир Иванович Мартынов:

– У вас очень много параметров, которые влияют на флуоресценцию вот этого белка, который вы планируете применять, полагаю, как сенсор. Это pH, температура и так далее. Все это не очень хорошо, наверное, потому что если использовать этот белок как донор FRET, то вот эти параметры, они как бы будут влиять на эксперименты. Есть ли какие-то мутанты, вот такие, может быть, улучшенные, в которых сокращено вот такое влияние.

Карен Сергеевич Саркисян:

– NowGFP был как раз таким мутантом и... Я не совсем с вами соглашусь, потому что на самом деле температура, например, она обычно в экспериментах по микроскопии поддерживается постоянной. А почти все флуоресцентные белки имеют так или иначе рН-зависимость флуоресценции. У NowGFP рК рН-зависимости - шесть и два, то есть оно не такое уж плохое. То есть он может подходит в качестве сенсора для визуализации каких-то процессов в кислых компонентах клетки, но и подходит для обычной метки, для визуализации чего-либо в обычных, нейтральных компонентах. А более лучшего мутанта у нас нет.

Вадим Тихонович Иванов:

– Долгих.

Дмитрий Александрович Долгих:

– Скажите, пожалуйста, вот вы делали мутагенез методом молекулярно-направленной эволюции, да. И какое количество клонов вы реально перебрали? То, что у вас, в общем, так сказать, на каком-то этапе не удалось достигнуть улучшения дальнейшего свойств связано, насколько вот это связано с тем, что, может быть, количество клонов недостаточное? Насколько реально вот как-то это увеличить?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Мы остановились на NowGFP, потому что мы как это... устали делать мутагенез. На самом деле белок уже был достаточно хорош.

Дмитрий Александрович Долгих:

– А в большом количестве все-таки?

Карен Сергеевич Саркисян:

– В один раунд просматривается там, может быть, сто тысяч. Или там иногда миллион клонов. Зависит от того, каким методом анализируется. Если глазами, на чашке, то там скорее сто тысяч. И, соответственно, у нас было пять раундов от WasCFP до NowGFP и еще два раунда до того. Довольно много.

Вадим Тихонович Иванов:

– Смотрю в зал. Похоже, вот сейчас вопросы иссякли. Да. Спасибо. Отдыхайте. Отзыв ведущей организации.

Владимир Александрович Олейников:

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный).

В отзыве содержатся следующие замечания. Первое: в работе слишком кратко описаны результаты как кристаллографического исследования, так и применения NowGFP в качестве донора энергии во FRET-сенсорах. Подробное изложение указанных результатов усилило бы текст диссертации. Второе: в оглавлении не указано наличие списка цитируемой литературы. Третье: в работе имеется минимальное количество англицизмов, однако, использование терминов «мутант» и «мутация» вместо «мутантная форма», «мутантный белок» и замена в тексте диссертации представляется неправильна. Но эти недочеты не умаляют достоинств.

А в целом диссертационная работа Саркисяна Карена Сергеевича «Флуоресцентные белки»... Соответствует работа требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация соответствует требованиям ВАК. Автор ее заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности ноль три ноль один ноль три «Молекулярная биология». Значит, отзыв обсужден на семинаре в лаборатории химических основ биокатализа ИМБ РАН, подписан доктором химических наук, профессором Димидкиной и утвержден заместителем директора ИМБ РАН, доктором биологических наук, профессором Карповым.

Вадим Тихонович Иванов:

– Карен Сергеевич, там были замечания. Хорошо бы ответить.

Карен Сергеевич Саркисян:

– На самом деле, там я согласен с первыми двумя замечаниями. Первое замечание было про то, что надо было получше и поподробнее описать кристаллографию FRET-сенсора. Согласен. В оглавлении не указано наличие списка литературы – это правда. С третьим замечанием я совсем не согласен. Значит, это замечание: «однако, использование терминов «мутант» и «мутация» вместо «мутантная форма», «мутантный белок» и замена в контексте диссертации представляется неправильным». Про англицизмы идет речь. Во-первых, «мутантная форма» тоже не содержит ни одного истинно русского слова. Во-вторых, на мой взгляд, мне не нравится, когда возникают такие переводные сочетания из двух слов, типа «эндонуклеаза рестрикции» или «мутантная форма». И, на мой взгляд, слово «мутант» в данном случае ничуть не хуже, а слово «мутация» вообще является общеупотребимым. Все.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Константин Анатольевич, есть желание охарактеризовать подчиненного? Явно есть.

Константин Анатольевич Лукьянов:

– Дорогие коллеги, Карен пришел в нашу лабораторию еще на курсовую, потом был диплом и аспирантура. И мы за это время хорошо поработали. Я очень доволен, что Карен к нам попал. Это большая удача была. Карен сочетает в себе - я вот думал, что сказать – совершенно замечательные свойства. Он очень умный, чрезвычайно. Он очень увлеченный, ему очень интересно работать в науке, и это тоже очень важно. А еще он очень работоспособный, чудовищно. Я таких людей, честно говоря, практически не видал. Вот бывают умные, но ленивые, бывают очень работоспособные, но не очень умные. А когда это все в одном человеке сводится, это производит совершенно колоссальный эффект. И, честно говоря, я могу признаться, что я ему дал это на пробу, потому что считал, что это невозможно сделать. Кто может зарядить триптофан в белке? Это же нереально. Оказалось, реально, если постараться. Я призываю проголосовать «за». Это очень хороший ученый. Он точно будет светить.

Вадим Тихонович Иванов:

– Хорошо, мы учтем ваши пожелания, спасибо. Ну, что, дальше у нас отзывы на... официальных оппонентов.

Владимир Александрович Олейников:

– Да, на автореферат нет отзывов

Вадим Тихонович Иванов:

–Значит, я даю слово Александру Сергеевичу Соболеву, Институт биологии гена, профессор, доктор биологических наук.

Александр Сергеевич Соболев:

(излагает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный).

– Благодарю. Глубокоуважаемый Вадим Тихонович, глубокоуважаемые коллеги. Об актуальности работы Карена Сергеевича говорить легко и приятно, хотя бы потому... по той простой причине, что практически невозможно найти современную работающую в области молекулярной биологии клетки лабораторию, которая бы не использовала бы флуоресцентные белки. Это, так сказать, тривиально. С другой стороны, любая вот такая лаборатория, поработав с флуоресцентными белками, начинает беспокоиться и думать, а как бы раздобыть белки с какими-то иными свойствами, с иными спектральными свойствами или с иным временем жизни, или с иными вариантами фотоконверсии и тому подобное. Это тоже тривиально, здесь я какая-то перекличка, я чувствую, с другим Александром Сергеевичем Аксеновым, который... Простите, Арсеньевым, который тоже любит слово «тривиально». Короче говоря, с моей точки зрения, это очевидно актуальная работа, очень интересная и, более того, вот сейчас, в ходе вопросов и ответов, появлялись еще новые идеи использования полученного, полученных Кареном Сергеевичем белков. Я, с вашего позволения, не буду останавливаться на описании работы, поскольку был сделан, по моему, отличный доклад, а то, что было не очень, с точки зрения слушателей, прояснено было хорошо объяснено в ответах на вопросы. Я хотел бы остановиться на том, что мне понравилось, и на том, на тех пожеланиях, соображениях, которые любая работа, значит, стимулирует. Начнем с того, что наибольшее впечатление, наиболее сильное позитивное впечатление на меня произвела архитектура исследования, то, как эта работа была экспериментально построена. От задумки, так сказать, этой работы, от дизайна через моделирование к мутагенезу, к описанию свойств полученных белков, к, собственно, к применению их, к возможным вариантам применения. Все это создает ощущение не просто цельности, а, вот знаете, такое чувство, я позволю себе такой образ, знаете, хорошая каменная кладка, где между камнями невозможно просунуть лезвие ножа. Вот так все это воспринимается мною. По крайней мере, по сути работы вот таких вопросов: а почему не сделано то? А почему не сделано это для доказательства? У меня лично не возникает. Поэтому я специально остановился на этом. Также отдаю себе отчет, что это заслуга и соискателя, и, конечно, его руководителя. Это, так сказать, в целом говорит о качестве работы и Карена Сергеевича, и той лаборатории, в которой он эту работу делал. Если говорить о частных достижениях, позитивах, то, конечно, это решение фундаментальной задачи – получение в белке анионной формы триптофана. Вот, казалось бы, такая сугубо фундаментальная проблема привела к очень интересным

решениям, которые явно будут иметь практическое применение. Во всяком случае, иметь белок, у которого время жизни примерно вдвое больше, чем у многих других белков, пять и одна десятая наносекунды, позволяет, в общем, его отчетливо отличать, используя метод FLIM, который, кстати, вот эти установки Becker & Hickl все больше и больше их становится в лабораториях у нас в России. Позволяет отчетливо отличать этот белок от любых других зеленых белков. Вот эти особенности фотоконверсии. Даже вот обсуждавшаяся сейчас мысль о том, чтобы использовать один из этих белков для фототермометрии. Вот все это говорит о том, что, в общем, на основании чисто фундаментального подхода получено решение как фундаментальной задачи, так и потенциально прикладной задачи, что опять же, так сказать, говорит в пользу соискателя. То, что мне хотелось бы обсудить в качестве пожеланий, это, на самом деле, к сути работы не имеет отношения. Как я уже сказал, с моей точки зрения здесь трудно придраться. Это, вот то, что я сейчас буду говорить, имеет отношение к тому, как работа, я имею в виду диссертация, автореферат поданы. Вот, например, мне хотелось бы получить ответ на вопрос такого рода. В диссертации примерно равное по объему место уделено белку WasCFP, и NowGFP. Но раз одинаковое место, то не совсем понятно, если WasCFP был не более, чем исходный белок? То тогда, наверное, не стоило было бы столь подробно его описывать, а больше внимания уделить тем характеристикам NowGFP, которые, кстати, вот, описание которых потребовало некоторых еще и вопросов. Если же у WasCFP есть какие-то особенности, которые его отличают от NowGFP, позитивные, тогда на них тоже стоило бы остановиться, отметив, что в таких-то и таких-то условиях использование этого белка было бы, скажем, более целесообразно. Тут есть еще одно замечание, вернее вопрос, связанный с выводом, который был сформулирован. Я его сейчас прочту. Что «восстановление анионного состояния хромофора и состояния три» - это страница шестьдесят первая диссертации, - «не происходит, так как аминокислотное окружение было необратимо изменено при фотоконверсии». Но все дело в том, что это утверждение автор поместил до своих, описания своих сделанных в содружестве, в соавторстве экспериментов по масс-спектрометрии. Кстати, опять вопрос тоже по этому поводу был. Вот если после масс-спектрометрии, тогда хотелось бы иметь несколько более развернутое доказательство этого вопроса и что, если говорить с формальной точки зрения, вот этот вывод стоило бы помещать после описания именно этих экспериментов. Теперь о замечаниях. Опять же, они относятся к самому, к самой подаче работы. В разделе «Материалы и методы» вообще отсутствует описание методик, используемых для кристаллографических исследований масс-спектрометрии. Я отдаю себе отчет в том, что эти эксперименты делались совместно с другими лабораториями, с другими людьми, о чем, кстати, написано в диссертации. Но, коль скоро, это диссертация в этом разделе «Материалы и методы» должны быть приведены, в общем-то, все те методы, которые могли бы быть воспроизведены другими авторами, к примеру. То же самое касается описания различных микроскопических систем. Они просто перечислены, и все. Вызывает некоторое удивление то, что в диссертации подписи на осях рисунков то по-русски, то по-английски. В общем, хотелось бы, чтобы это был один язык, и, наверное, все-таки, я думаю, что коллеги согласятся со мной, коль мы защищаем работу и пишем ее по-русски, то, наверное, все-таки по-русски. Вот использование терминов меня несколько тоже смущает. Например, один и тот же процесс называется то фолдингом, то

сворачиванием. Даже появляется очень интересный термин «сфолдировавшийся». В общем, если уж использовать термин «сворачиваться», то уж «свернутый», мне кажется, слышится и смотрится лучше. И, наконец, своеобразен взгляд автора на то, что нужно помещать в заключение. Казалось бы, в заключении можно было бы как-то подытожить то, что автор написал. Однако он поступил по принципу, вот то, что в англоязычных статьях называется Summ up. То есть решил упомянуть те работы, которые появились после того, как он написал диссертацию на данную тему. Вот это не более чем такое легкое покусывание, то, что сейчас я сказал. Поэтому если говорить по сути дела, я хочу сказать, что это отличная работа. Она заслуживает очень высокой оценки. Я не знаю, необходимо произносить все эти сакральные слова, которыми завершается отзыв, но, если необходимо, я, конечно, зачитаю. Если нет необходимости, то я хотел бы...

Вадим Тихонович Иванов:

– Я считаю, что мы и так уже поняли все.

Александр Сергеевич Соболев:

– Да. Короче говоря, некоторые заключительные фразы, чтобы было ясно и однозначно, все-таки я произнесу. С моей точки зрения, работа полностью соответствует всем требованиям диссертации на соискание кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология». И, конечно, Карен Сергеевич заслуживает присуждения степени, которую он хочет получить.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Карен Сергеевич, вам слово.

Карен Сергеевич Саркисян:

– Спасибо за вопросы и замечания. Сейчас. Я со всем согласен. Приношу извинения за подписи на английском на рисунках и отсутствие материалов и методов. Их действительно надо было поместить. Согласен даже с использованием, что «сворачивание» лучше, чем «фолдинг», а термин «сфолдировавшийся» и «вытетровывание» можно было тоже не писать.

По поводу того, значит, два замечания по сути о том, что WasCFP может быть не стоило так подробно описывать, если это был всего лишь промежуточный мутант на пути к NowGFP. И если WasCFP обладал какими-то преимуществами, то это можно было бы указать в диссертации. Да, действительно, я согласен, что можно было бы это указать в диссертации. В каком-то смысле WasCFP обладал преимуществами, потому что его рК флуоресценции было в области там семи, кажется, семь и три. Что на самом деле означает, что использовать его как сенсора, как, например, рН-сенсор, то это как раз то самое рК, в котором будет наиболее большой динамический диапазон у рН-сенсора. О недостатках я уже говорил, что доля вот этой новой спектральной формы была мала, и, на самом деле, белок плохо фолдировался в бактериях. Поэтому нельзя сказать, что он прям конечный белок, который можно использовать. Просто с точки зрения описания его характеристик это было еще интереснее, потому что он всего лишь на четыре мутации отличался от исходного

белка. И нам, поскольку действительно хотелось понять, что форма соответствует анионному состоянию хромофора, то удобнее работать с системой, которая недалеко ушла от исходного, с точки зрения интерпретации.

В главе «Фотопереключения» сделан вывод о том, что аминокислотное окружение было необратимо изменено при фотоконверсии. Этот вывод описан до того, как мы описываем, собственно, структурные основы и данные масс-спектрометрии. Я согласен, что, возможно, логичнее было поместить это после, после описания данных масс-спектрометрии, но, с другой стороны, логика работы была в том, чтобы мы сначала сформулировали наши предположения какие-то структурные, а потом получили структуру. И поэтому я как бы сохраняю, постарался сохранить какую-то логику и интригу в изложении диссертации. По-моему, все.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Второй оппонент – Мельник Богдан Степанович, Институт белка Пущинский, в командировке. Его отзыв зачитает Владимир Александрович.

Владимир Александрович Олейников:

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный).

Содержит следующие замечания. Первое: в диссертации отмечено, что наряду с ключевой аминокислотной заменой, это эль двести семь ку, повлиявшей на образование анионной формы хромофора 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 чувствительным к изменениям окружающей среды по сравнению с WasCFP и NowGFP. Второе: 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 белка светом высокой интенсивности. Третье: описываемый мутагенез белка WasCFP, автор приводит ряд спектральных данных мутантов, однако, подробно не описывает их свойств и различия между мутантами. В частности, из приведенных на рисунке четыре четырнадцать спектров поглощения не ясно, как именно был отобран мутант один, спектр поглощения которого незначительно отличается от спектров WasCFP. Четвертое: на мой взгляд, было бы интересно подтвердить анионное состояние триптофана с помощью ЯМР как по протонам и по азоту, 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. Пятое: в диссертации присутствует ряд опечаток и неточностей, например, ряд рисунков, на которых изображены различные спектры, озаглавлены «Направленная эволюция» многоточие. Очевидно, что более уместными были бы названия, описывающие то, что изображено на

рисунке, а не то, какие выводы из этого сделали. Тем не менее, перечисленные выше замечания не повлияли на общее впечатление, хорошее впечатление от работы. Значит, новизна и обоснованность. В диссертации представлены новые данные по целому ряду вопросов в области биофизики, флуоресцентных белков, химии их посттрансляционных модификаций и светоиндуцируемых процессов. Полученные в результате работы белки являются новыми молекулярными инструментами для флуоресцентной микроскопии. Полученные в работе данные тщательно проанализированы, а полученные результаты не вызывают сомнения. Вывод диссертации соответствуют полученным в ней результатам. И на основании изучения диссертации и автореферата, а также опубликованных автором работ, могу заключить, что работа актуальна, является современным научным исследованием, выполненным на высоком экспериментальном уровне. Значит, результаты диссертационной работы получены впервые. По результатам опубликованы четыре статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК Российской Федерации. Автореферат полностью соответствует и корректно отражает основные результаты и выводы диссертации. И, соответственно, диссертационная работа Саркисяна Карена Сергеевича полностью соответствует требованиям ВАК, а именно пункту девятому Положения о присуждении ученых степеней, утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от двадцать четвертого девятого тринадцатого номер восемьсот сорок два. И, соответственно, ее автор - присуждению искомой научной степени, кандидата биологических наук по специальности ноль три ноль один ноль три «Молекулярная биология». Подписано - руководитель группы спектроскопии белка института белка РАН, Мельник Богдан Степанович.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Карен Сергеевич, вам слово для ответов.

Карен Сергеевич Саркисян:

– Первое замечание по поводу того, что мы, помимо мутаций, которые вошли в конечный белки, увидели еще ряд мутаций, которые также стабилизируют анионную форму, и они появлялись неоднократно, но в конечный вариант не попали. И было бы интересно сделать мутанта, который собрал бы все обнаруженные улучшающие мутации. Я согласен. Мы даже уже сделали последовательность гена и собираемся его заказать, который бы действительно содержал бы все эти мутации в надежде на то, что этот белок будет лучше и, может быть, даже будет за счет большей стабильности анионной формы меньше подвержен фотоконверсиям. Второе замечание. Сейчас. Недостаточное внимание уделено вопросу обсуждения фотостабильности. Я вот постарался в докладе сделать на этом акцент. Действительно, в диссертации я мало это обсуждал, и, значит, в замечании говорится о том, что фотоконверсия ставит под вопрос применимость NowGRP для продолжительных экспериментов, связанных с облучением светом высокой интенсивности. Да, я бы не рекомендовал NowGRP для экспериментов, связанных с облучением, долгих экспериментов, связанных с облучением светом высокой интенсивности. Описываемый мутагенез WasCFP автор приводит ряд спектральных данных мутантов, однако, подробно не описывает их свойства и различия между

мутантами. В частности, из приведенных на рисунке спектров поглощения не ясно, как именно был отобран мутант один, спектр поглощения которого незначительно отличается от спектров WasCFP. Мутант один был отобран, потому что он лучше сворачивался в бактериях. И, действительно, в соотношениях между двумя формами в нем не сильно отличался от WasCFP. Было бы интересно подтвердить данное состояние триптофана с помощью ЯМР по протону и по азоту. Это могло бы стать окончательным прямым подтверждением, что хромофор анионный. Да, мы даже начали работы по определению протонных спектров, и там были интересные результаты, но с неоднозначной интерпретацией. Чтобы однозначно интерпретировать, надо было сделать еще спектр по азоту, а для этого надо вырастить сначала белок с меченым азотом, и... Мы пока этого не сделали. С пятым замечанием – опечатки, неточности и подписи к рисункам - я согласен.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо.

Карен Сергеевич Саркисян:

– Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Переходим к общей дискуссии. Кто бы хотел поделиться впечатлениями и дать какие-то рекомендации? Евгений Давыдович, прошу. Давайте к микрофону. Потому что все-таки...

Евгений Давыдович Свердлов:

– А если громко, потому что я...

Вадим Тихонович Иванов:

– Записывается все, протоколируется.

Евгений Давыдович Свердлов:

– Тогда другое дело. Собственно говоря, я думаю, что не надо тратить слов напрасно. Все ясно и так. Перед нами была блестящая работа, блестяще сформулированная в докладе и блестящие ответы на вопросы. Все это демонстрирует высокий уровень диссертанта и то, что он, безусловно, на мой взгляд, достоин искомой степени. А на трибуну я вышел, все, что я сказал, и так ясно, по-моему, чтобы как человек, многие годы работающий с генетической литературой и на этом потерявший все волосы, я, соответственно, хочу сказать, что «мутант» и «мутантная форма» равно используются в литературе. Иногда удобно, действительно, сказать «мутантная форма» и даже трудно оценить, что используется чаще. Поэтому я согласен с диссертантом в его ответах на замечания организации, давшей отзыв. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Кто-нибудь еще хотел бы выступить? Сразу двое желающих. Давайте Владимир Захарович, а потом Габибов.

Владимир Захарович Плетнев:

– Уважаемые коллеги, я довольно хорошо знаком с работой, которая была сегодня доложена. Действительно, получен... У меня высокая оценка этой работы. Получен прекрасный результат. Получен, с моей точки зрения, замечательный генно-инженерный вариант нового биомаркера на основе уникального хромофора с анионным триптофаном. Дело в том, что депортонировать триптофан очень сложно. Тем не менее, Карену Сергеевичу удалось создать такое окружение хромофора, которое позволило оторвать этот протон, создать его анионную форму. При этом произошел сдвиг флуоресценции из циановой в зеленую форму. И новый объект, он действительно обладает самой яркой зеленой флуоресценцией среди всех зеленых флуоресцентных белков. И самой высокой продолжительностью времени жизни флуоресценции.

Это, действительно, очень хороший объект, а что касается его фотостабильности, то Карен Сергеевич почему-то не упомянул, что у него был получен один мутант, который увеличил время, который увеличил фотостабильность примерно в два с половиной раза. Дело в том, что, когда происходит разрушение лизина, то это порождается всегда переходом хромофора, вернее, триптофана в этом случае, из цис-положения в транс-положение. При этом образовывается пи-катионное взаимодействие шестичленного кольца лизина с аминогруппой лизина. И если этот процесс затормозить, то можно увеличить фотостабильность. Поэтому когда Карен Сергеевич заменил близко расположенный остаток аланина на более объемный остаток валина, то это привело к стерическому затруднению и такой трансформации цис в транс. И привело соответствующим образом к увеличению фотостабильности, как я уже сказал, в два с половиной раза. Там еще есть возможности поработать над этим процессом, и, может быть, полностью затормозить такой переход. И тогда мы получим, можно получить объект практически фотостабильный.

Что касается самого диссертанта, я согласен с его руководителем. Это действительно очень квалифицированный, профессионально подготовленный ученый с высокой работоспособностью. В этом я убедился, когда мы проводили совместные работы вот по ряду белков, которые он докладывал. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Так, Александр Габирович. У вас было желание? Прошу.

Александр Габирович Габиров:

– После такого разбора профессора Плетнева, я думаю, что, может, и не надо выступать. Вы знаете, я, мне очень понравилось, я хочу поддержать этот тренд, который сказал Константин. Вот, значит, Карен – очень талантливый человек. Я имел удовольствие с ним быть на двух семинарах, и они были посвящены тиразиновым киназам. Во всяком случае, один. И я увидел глубокое знание предмета. И когда я спросил, в какой лаборатории работает, я понял, что это совершенно не соответствует его основной тематике. Вот видно, что человек талантливый. И очень приятно. И я, к сожалению, вот, Николай, не обижайся, как раз наша дискуссия прошлого ученого совета, так сказать, подтверждает, скорее, мою правоту, что у нас защиты очень

серьезные бывают. И когда люди талантливые, и, так сказать, богом предрасположенные к науке, то приятно это слушать. Теперь я, все уже говорили о диссертации. Как мне показалось, может быть, вам такой некомпетентный скрин и понравится. Мне кажется, главное – очень много флуоресцентных белков сделано вами и не вами, но здесь, конечно, вот результат, который вы получили в электронной микроскопии, он, по-моему, является таким для вашей работы. Димидкина против использования англицизмов, она заведует бывшей моей лабораторией, Бромштейна, я могу ее критиковать даже заочно, вот. Мне кажется, это очень интересный путь, и вы на нем сделаете... Я хотел задать вопрос. А вы разлагаете экспоненты?

Карен Сергеевич Саркисян:

– Да.

Александр Габирович Габибов:

– Собственно, я хотел, но просто очень много. Спасибо. Я призываю всех голосовать «за» и приятно, что здесь сочетание трудолюбия и таланта, вот оно слилось и получился прекрасный фьюз.

Вадим Тихонович Иванов:

– Есть еще желающие по поводу дискуссии. Очевидно, всем все ясно. Я подтверждаю это общее ощущение. Сегодня хороший день. Сегодня были две прекрасные работы, и, мне кажется, у нас не будет проблем с голосованием, к которому я призываю и подключиться. Перед этим единственное: есть какие-то замечания по поводу проекта заключения? Я потом вам дам слово заключительное. Да. Какие-то замечания есть по поводу проекта заключения? Не вижу. Там довольно очевидные вещи. Заключительное слово диссертанта.

Карен Сергеевич Саркисян:

– Я хотел бы сказать всем, кто работает в нашей лаборатории, я имею в виду не только лабораторию биофотоники, а вообще нашу большую лабораторию, огромное спасибо. Я очень рад, что я провел там последние шесть лет именно здесь. Я хочу отдельно сказать большое спасибо людям, которые занимаются административной работой, потому что это позволяет работать в идеальных условиях, когда ты занимаешься только научной деятельностью. Я хочу еще также сказать большое спасибо Татьяне Игоревне и Саше Царьковой, которые помогли мне с защитой диссертации и с подготовкой к ней. И я хочу извиниться перед теми людьми, которые пострадали от совместной работы со мной. И, конечно, я хочу сказать спасибо моим руководителям, Александру Мишину и Константину Лукьянову, за огромное терпение, за предоставление мне полной свободы действий и за прекрасное очень личное руководство, которое я очень ценю. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Значит, я сейчас объявляю перерыв на голосование, но просьба не расходиться, поскольку у нас есть в повестке дня еще один вопрос. Простой, но, тем не менее, он имеет место быть. Голосуем.

Вадим Тихонович Иванов:

– Я так понимаю, счетная комиссия посчитала.

Председатель счетной комиссии:

–Саркисян Карен Сергеевич. Присутствовало двадцать три, роздано двадцать три, оказалось в урне двадцать три, «за» - двадцать три, «против», недействительных нет.

Вадим Тихонович Иванов:

– Прошу утвердить итоги голосования. Кто за? Несмотря на то, что единогласно редко бывает.

(Проходит голосование по проекту заключения совета. Заключение совета принято единогласно.)

Поздравляем с успешной защитой. Успехов вам. Вот. И спасибо за работу. Я так понимаю, это последняя защита на совете в этом году?

Вадим Тихонович Иванов:

– Предварительные поздравления с наступающим Новым годом, но еще мы будем встречаться не раз в этом году.

Председатель диссертационного совета
академик РАН



В.Т.Иванов

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников