

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».

Флуоресцентные белки наиболее известны в качестве молекулярных маркеров, используемых для визуализации клеточных структур и процессов. Они представляют собой семейство белков с интересной эволюционной историей и уникальными посттрансляционными модификациями. На сегодняшний день в области изучения флуоресцентных белков активно ведутся работы по созданию новых мутантных форм этих белков, адаптированных под конкретные задачи микроскопии. Также, продолжается изучение фотофизических свойств, механизмов сворачивания и химии посттрансляционных изменений флуоресцентных белков. Отдельно стоит отметить, что флуоресцентные белки являются прекрасным объектом для изучения особенностей фолдинга сложных многостадийно сворачивающихся белков.

Диссертация К.С. Саркисяна посвящена созданию новой группы флуоресцентных белков, характеризующихся новым, не описанным ранее состоянием триптофанового хромофора. Работа представляется интересной как для дальнейших фундаментальных, так и для прикладных исследований. Созданные автором мутантные формы белков обладают долгим временем жизни флуоресценции, благодаря анионному состоянию триптофанового хромофора при физиологических условиях.

Основные результаты полученные в работе.

Результатами этой работы следует считать не только получение конкретных мутантных форм зеленого флуоресцентного белка, но и методики/подходы успешно примененные автором для их получения.

Методами рационального дизайна и направленной эволюции циановых флуоресцентных белков с триптофановым хромофором были получены зеленые флуоресцентные белки, характеризующиеся наличием новой спектральной формы.

Проведено детальное исследование спектральных свойств белка WasCFP. На основании экспериментальных данных предложена интерпретация возникновения нового спектрального состояния, как ионизации хромофора по индольному фрагменту триптофана. Анионное состояние триптофанового хромофора ранее не было известно во флуоресцентных белках, а ионизация индольного фрагмента триптофана в биологической системе описана автором впервые.

С помощью направленной эволюции на основе белка WasCFP создан белок со значительно стабилизированной анионной формой хромофора, доминирующей при высоких температурах и нейтральных pH (в работе белок назван NowGFP).

В белке NowGFP обнаружен новый тип фотоконверсии, в результате которой происходит смена зеленой флуоресценции на циановую.

В белках WasCFP и NowGFP обнаружено долгое для флуоресцентных белков время жизни флуоресценции (около 5нс).

На основании данных как *in vitro*, так и *in vivo*, было показано, что белок NowGFP открывает для зеленых флуоресцентных белков новый временной канал в микроскопии времени жизни флуоресценции.

Разработаны генетически кодируемые FRET-сенсоры, превосходящие большинство существующих сенсоров по динамическому диапазону и обладающие наибольшим ферстеровским радиусом среди существующих FRET-сенсоров.

Методами кристаллографии решена структура белка NowGFP, а также структура фотоконвертированного состояния NowGFP. Расшифровка структуры подтвердила предполагаемый контакт аминокислотной группы лизина-61 с индольным фрагментом хромофора, а также позволила ответить на вопрос о структурных основах наблюдаемой фотоконверсии.

Список замечаний по диссертации и автореферату

1. В диссертации отмечено, что наряду с ключевой аминокислотной заменой L207Q, повлиявшей на образование 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 белка 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 ^1H , так и по ^{15}N , 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.

Тем не менее, перечисленные выше замечания не повлияли на общее хорошее впечатление от работы.

Новизна и обоснованность полученных результатов

В диссертации представлены новые данные по целому ряду вопросов из 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 сомнений. Выводы диссертации соответствуют полученным в ней результатам.

Заключение


На основании изучения диссертации, автореферата, а также опубликованных автором работ, я могу заключить, что диссертационная работа К.С. Саркисяна актуальна и является современным научным исследованием, выполненным на высоком экспериментальном уровне.

Результаты диссертационной работы получены впервые. По результатам диссертации опубликованы четыре статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ. Достоверность результатов и выводов не вызывает сомнений. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и корректно отражает основные результаты и выводы диссертации.

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».

Руководитель группы спектроскопии белка ИБ РАН,

к.ф.-м.н.

30.11.2015 

Мельник Богдан Степанович

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института белка Российской академии наук (ИБ РАН)
ул. Институтская, д. 4, г. Пущино, Московская обл., 142290
Тел. (495)514-02-18; факс (4967)318-435 E-mail: protres@vega.protres.ru



Собственноручно за подписи
Д.С. Мельник
достоверно зав. канцелярии
Подпись: 