

ОТЗЫВ

официального оппонента Васина Андрея Владимировича
на диссертацию Бубликова Григория Сергеевича
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.03 «Молекулярная биология»
на тему «Фотофизические свойства флуоресцентных маркеров iRFP713,
iRFP682 и iRFP670, созданных на основе бактериальных фитохромов».

Флуоресцентные белки представляют собой мощный инструмент для изучения и визуализации молекулярно-биологических процессов, происходящих как внутри отдельных клеток, так и на уровне всего организма. Диссертационная работа Г.С. Бубликова посвящена изучению оптических свойств созданных на основе бактериальных фитохромов флуоресцентных маркеров iRFP713, iRFP682 и iRFP670. Автором были изучены характеристики и описаны свойства этих фитохромов, а также получены их рекомбинантные изоформы с улучшенными фотофизическими характеристиками. Разработка новых флуоресцентных маркеров с оптимальными фотофизическими свойствами необходима, в том числе, для решения проблемы прижизненной визуализации органов и тканей при изучении патогенеза различных заболеваний, что, безусловно, определяет актуальность представленной работы.

Цель проведенных автором исследований состояла в выяснении факторов, определяющих спектральные свойства, квантовый выход и молекулярную яркость флуоресценции димерных флуоресцентных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670, созданных на основе бактериальных фитохромов.

Для достижения поставленной цели автором были решены следующие задачи:

- проведено изучение процессов сворачивания – разворачивания флуоресцентного белка iRFP713 и выяснена роль узла, образованного его аминокислотной последовательностью, в процессах их сворачивания – разворачивания;

- проведено сравнительное изучение спектральных свойств димерных белков iRFP682 и iRFP670, имеющих, в отличие от iRFP713, в каждом мономере два цистеиновых остатка, потенциально способных связывать биливердин;

- созданы мутантные формы белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670, имеющие цистеиновые остатки, способные связывать биливердин, в PAS или в GAF доменах каждого мономера (iRFP670/C256S, iRFP682/C256S, iRFP713 и iRFP670/C15S, iRFP682/C15S и iRFP713/C15S/V256C, соответственно), имеющие цистеиновые остатки как в PAS, так и в GAF доменах (iRFP670, iRFP682 и iRFP713/V256C), и не имеющие цистеиновых остатков вовсе (iRFP670/C15S/C256S, iRFP682/C15S/C256S и iRFP713/C15S);

- изучены спектральные свойства и процессы разворачивания – сворачивания созданных мутантных рекомбинантных форм белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670.

Достоверность полученных результатов определяется тем, что работа выполнена с использованием современных молекулярно-биологических и биофизических методов, экспериментальные данные грамотно обработаны.

Научная новизна работы объясняется тем, что в работе впервые показано, что именно ковалентно связанный с фитохромом iRFP биливердин препятствует обратимости денатурации данного белка, особенности флуоресцентных свойств ряда белков данного класса связаны со взаимодействием цистеиновых остатков с флуорофором и их влиянием на стабильность белка в растворе. Кроме того, получена оригинальная мутантная форма белка iRFP713/V256C, которая имеет наибольший, среди известных к настоящему времени флуоресцентных белков на основе бактериальных фитохромов квантовый выход и молекулярную яркость

флуоресценции. Показано, что спектральные свойства димерных фитохромов в значительной степени определяются межмономерным и междоменным аллостерическим влиянием цистеиновых остатков, которое препятствует или способствует ковалентному связыванию биливердина во втором мономере димерных фитохромов.

Флуоресцентные белки, изучению и оптимизации свойств которых посвящена работа, являются инструментом для решения прикладных задач молекулярной и клеточной биологии и медицины, что объясняет практическую и теоретическую значимость работы. Прижизненная визуализация процессов в клетках и в организме необходима как для понимания собственно процессов, происходящих в живых клетках, так и при разработке модельных систем для изучения заболеваний человека и тестирования на них потенциальных терапевтических агентов и методов диагностики. Информация о деталях механизмов формирования пространственной структуры активных фитохромов и их функционирования, полученная в работе, необходима для изучения фундаментальной проблемы фолдинга полипептидов и для разработки новых форм фитохромов с улучшенными свойствами.

Диссертация построена по традиционному принципу, соответствует требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011, изложена на 130 страницах машинописного текста, иллюстрирована 2 таблицами и 39 рисунками. Библиографический указатель включает 195 источников на русском и иностранном языках. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены в ходе выполнения Программы «Молекулярная и клеточная биология» (грант К.К. Туроверова), грантов РФФИ (№13-04-0814) и РНФ (№14-24-00131). Автореферат и публикации отражают содержание диссертации. Статьи по теме диссертации опубликованы в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, входящих в Перечень реферируемых журналов, рекомендованных ВАК. Результаты работы неоднократно

докладывались на отечественных и зарубежных конференциях и симпозиумах. Работа логично написана и хорошо оформлена.

Выводы, сформулированные в диссертации, полностью соответствуют экспериментальным данным, приведённым в работе, и положениям, выносимым на защиту.

В диссертации не обнаружено существенных недостатков. Однако есть отдельные замечания, связанные с формой подачи отдельных подпунктов раздела «Материалы и методы». На ряде графиков не читаются данные о статистическом разбросе данных в экспериментальных точках. Также в некоторых таблицах приводятся только средние значения параметров. Однако обобщения и выводы, которые делаются после обсуждения, несомненно, соответствуют полученным экспериментальным данным. Приведённые замечания не умаляют ценности работы. В порядке дискуссии хотелось бы задать вопрос о возможности применения описываемых в работе белков для прижизненной визуализации распространения вирусной инфекции в организме модельного животного, принципиальной возможности такого применения фитохромов и данных литературы по этому вопросу.

Заключение. Представленная диссертация является научно-квалификационной работой, в которой решается важная задача получения фотофизических характеристик и модификации комплексов бактериальных фитохромов с биливердином с целью улучшения свойств этих флуоресцентных маркеров. В рамках поставленной задачи диссертация представляет собой законченное научное исследование, выполненное автором самостоятельно на высоком методическом уровне. Полученные результаты достоверны, выводы обоснованы. По объёму, уровню, и новизне полученных результатов работа отвечает требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней, а ее автор – Бубликов Г.С. – заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

И.о. директора федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией структурной и функциональной протеомики, кандидат биологических наук

А.Васин

Васин Андрей Владимирович

«14» апреля 2016 года

197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д.15/17, тел. +7(812)4991500,
e-mail: office@influenza.spb.ru

Подпись официального оппонента Васина А.В. заверяю.

Ученый секретарь федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат медицинских наук



«14» апреля 2016 года

Лобова Тамара Геннадиевна