

## **СТЕНОГРАММА**

Заседания 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  
4 октября 2017 года

Защита диссертации  
на соискание учёной степени кандидата биологических наук  
**Божановой Нины Георгиевны**

**Разработка и изучение флуоресцентных меток методами  
моделирования и молекулярной эволюции белков**

специальность: 03.01.03 — молекулярная биология

Москва — 2017

## СТЕНОГРАММА

Заседания 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 от 4 октября 2017 года.

Председатель диссертационного совета д.х.н., академик РАН **Иванов В.Т.**

Учёный секретарь диссертационного совета д.физ.-мат.н. **Олейников В.А.**

Из 30 членов совета на заседании присутствует 22 человека, из них докторов по профилю диссертации — 7 человек:

1.	Иванов Вадим Тихонович	академик РАН, д.х.н.	02.00.10
2.	Ефремов Роман Гербертович	д.физ.-мат.н., проф.	02.00.10
3.	Олейников Владимир Александрович	д.физ.-мат.н.	03.01.06
4.	Арсеньев Александр Сергеевич	д.х.н., проф.	02.00.10
5.	Бовин Николай Владимирович	д.х.н., проф.	03.01.06
6.	Габибов Александр Габибович	академик РАН, д.х.н.	03.01.06
7.	Деев Сергей Михайлович	чл.-корр. РАН, д.б.н.	03.01.03
8.	Дзантиев Борис Борисович	д.х.н., проф.	02.00.10
9.	Долгих Дмитрий Александрович	д.б.н., проф.	03.01.03
10.	Завриев Сергей Кириакович	чл.-корр. РАН, д.б.н.	03.01.06
11.	Зарайский Андрей Георгиевич	д.б.н., проф.	03.01.03
12.	Зубов Виталий Павлович	д.х.н., проф.	03.01.06
13.	Лукьянов Сергей Анатольевич	академик РАН, д.б.н.	03.01.03
14.	Мирошников Анатолий Иванович	академик РАН, д.х.н.	03.01.06
15.	Мурашев Аркадий Николаевич	д.б.н., проф.	03.01.06
16.	Патрушев Лев Иванович	д.б.н., проф.	03.01.06
17.	Сапожников Александр Михайлович	д.б.н., проф.	03.01.03
18.	Свердлов Евгений Давидович	академик РАН, д.х.н.	03.01.03
19.	Уткин Юрий Николаевич	д.х.н., проф.	02.00.10
20.	Формановский Андрей Альфредович	д.х.н.	02.00.10
21.	Шапаронов Михаил Иванович	д.х.н.	02.00.10
22.	Шпаковский Георгий Вячеславович	д.б.н.	03.01.03

**Иванов Вадим Тихонович:** Следующая диссертация представлена Ниной Георгиевной Божановой, материалы личного дела которой доложит нам Владимир Александрович.

**Олейников Владимир Александрович:**

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

**Иванов Вадим Тихонович:** Все ли правильно, нет уточнений, вопросов? По-видимому, так. Нина Георгиевна, Вам слово. Двадцать минут для доклада.

**Божанова Нина Георгиевна:**

*(Излагает основные положения диссертационной работы)*

**Иванов Вадим Тихонович:** Вопросы?

**Патрушев Лев Иванович:** Спасибо большое за прекрасный доклад. Я хотел бы узнать ваше мнение относительно возможности использования в качестве флуороген-активирующих субстанций аптамеров, пептидных или олигонуклеотидных. Вообще, скрининг был бы гораздо проще, мне кажется, там можно было бы найти что-нибудь такое.

**Божанова Нина Георгиевна:** Спасибо за вопрос. Аптамерные метки на основе примерно тех же самых веществ, которые являются аналогами хромофоров флуоресцентных белков, уже существуют – это шпинат, это брокколи, и желтый аптамер, РНК-аптамер corn. Они опубликованы, они используются сейчас. В нашем случае мы нацеливались на метки для исследования белков, соответственно, аптамеры на основе РНК или ДНК в нашем случае не подходят. С точки зрения пептидов это было бы очень хорошо, найти пептид, который может связывать флуороген, до сих пор ничего не сделано. Проблемой для поиска пептидов для стабилизации хромофоров является то, что маленький размер пептида может неэффективно стабилизировать хромофор, и, возможно, просто не будет являться успешной флуороген-активирующей меткой.

**Патрушев Лев Иванович:** Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** У меня такой общий вопрос для понимания. Если взять зеленый флуоресцентный белок, там хромофор ковалентно связан с белком, это единое целое, он встроен в белок. Ваши все объекты, они содержат хромофор, который нековалентно связан с белком: может диссоциировать, там есть некоторые скорости диссоциации и прочее. Какие плюсы и минусы этих двух типов флуоресцентных объектов для практического использования? Что лучше, что хуже, где преимущество, где недостаток?

**Божанова Нина Георгиевна:** Спасибо за вопрос. Преимущества и недостатки есть у обеих систем. Если мы рассматриваем флуоресцентный белок, у которого хромофор ковалентно встроен, то большинство таких белков флуоресцентны постоянно. То есть, есть некоторые белки, которые можно включать/выключать, их меньшинство. Основные используемые белки постоянно светятся, соответственно, мы не можем включить или выключить его в произвольное время. В случае флуороген-активирующего белка добавление и отмывание хромофора из системы позволяет выключить и включить его в произвольное время. Также флуоресцентные белки имеют такой параметр как время созревания, и оно составляет несколько десятков минут, потому что в процессе созревания хромофора

флуоресцентного белка происходит ряд химических процессов: циклизация, дегидратация и окисление, которые требуют времени. Если мы хотим исследовать какие-то очень быстрые процессы, флуоресцентные белки для этого часто не подходят. В случае флуороген-активирующих белков, белок сворачивается в течение нескольких минут после схода с рибосомы, и добавление флуорогена позволяет детектировать процессы, которые происходят очень быстро.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Есть ли еще вопросы? Сначала с заднего ряда, потом предпоследний ряд.

**Введенский Андрей Владимирович:** Спасибо за доклад. Скажите, пожалуйста, а вот этот белок, который вы использовали, липокалин, какую он функцию выполняет и по каким параметрам вы его нашли? Какие исходные данные вы вводили, чтобы его выделить?

**Божанова Нина Георгиевна:** Спасибо за вопрос. Липокалины – это семейство белков, которые имеют сходную пространственную структуру бета-бочонка, и в целом они являются разными переносчиками, чаще всего гидрофобных соединений. Непосредственно для использованного белка не совсем понятны его функции, есть некоторые предположения, что они переносят фосфолипиды, однако это еще не доказано до конца. При этом, так как липокалины имеют небольшую структуру и довольно обширный связывающий карман, они были выбраны по данному принципу. Из всех липокалинов, для которых известна третичная структура, их не так много, был выбран непосредственно этот за отсутствие дисульфидных связей в структуре.

**Иванов Вадим Тихонович:** Вопрос еще один, попрошу.

**Хренова Мария Григорьевна:** Да. Во-первых, я тоже хочу поблагодарить за доклад, очень хорошо все скомпоновано, очень интересно было слушать. Вопрос такой. В последней части работы вы проводили докинг до десяти тысяч мутантных форм белка и на основе их выбирали. Понятно, что если вы делаете такой обширный скрининг, то те критерии, которыми вы пользуетесь, они должны быть на самом деле очень простыми, иначе вы будете очень долго просто считать, правильно? Может быть, можно чуть сэкономить время и электричество и просто взять тот белок, для которого у вас уже есть предполагаемая пространственная структура, комплекс белка с лигандом, и просто на основе каких-то простейших химических представлений про водородные связи, что-то такое, пытаться подобрать несколько структур просто на основе визуальной инспекции, не проводя вот такой обширный докинг? Как вы думаете?

**Иванов Вадим Тихонович:** Можно в сжатом виде повторить вопрос, чтобы все.... У вас микрофона нет, в микрофон. Чтобы все услышали, нам в микрофон скажут, в чем суть вопроса.

**Божанова Нина Георгиевна:** Вопрос состоит в том, почему нельзя заместить тот обширный докинг, который мы проводили с несколькими тысячами белков, просто взяв за основу уже известный комплекс белка с лигандом и попробовать модифицировать лиганд, чтобы прийти к той же самой...

**Хренова Мария Григорьевна:** Нет, нет, мутации. Просто предложить мутации именно на основе визуальной инспекции, а не проводя такой обширный докинг. Нет, ту же самую задачу решать, только по-другому.

**Божанова Нина Георгиевна:** Это было бы хорошо, если у нас был бы уже белок с лигандом, который способен к флуоресценции, и мы могли бы его изменять таким образом. Но если мы не знаем, какой белок будет связывать этот лиганд хоть с минимальной константой связывания, то стартовать практически не с чего.

**Хренова Мария Григорьевна:** Мне кажется, наверное, я, может быть, не очень хорошо сформулировала вопрос. Речь шла вот о той стадии последней, когда вы сказали, что у вас уже есть константа диссоциаций 100 наномоль и дальше вы, с одной стороны, делаете случайный мутагенез, а с другой стороны делаете вот этот вот докинг. То есть вот в тот момент у вас же уже есть некий комплекс с вот этой константой диссоциаций 100 наномоль.

**Божанова Нина Георгиевна:** Ну, на этой стадии уже я не могу сказать, что докинг занимает очень много времени, потому что мы не делаем библиотеку из ста тысяч структур, мы стартуем с одной структуры. Мы не изменяем хромофор, потому что синтез хромофора – это довольно сложная система. Мы изменяем белок. Возможно, можно сделать какие-то рациональные замены, однако рациональных замены за один шаг Вы можете сделать, наверное, одну, максимум две рациональные замены, предположить, как изменится белок при помещении туда трех-четырёх-пяти аминокислот уже невозможно. Поэтому я считаю, что затраты электроэнергии и дизайн с помощью специализированных компьютерных программ все-таки оправдывается, потому что мы получили ряд замен, которые... некоторые из них мы до сих пор не можем объяснить, почему они влияют, однако они имеют очень драматическое влияние на изменение свойств этого белка. То есть часть замен действительно можно предсказать рационально, часть замен, которые мы получили, они действуют в комплексе друг с другом, и рациональным путем получить эти замены очень сложно.

**Хренова Мария Григорьевна:** Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Еще вопросы? По-видимому, вопросов нет. Спасибо, можете передохнуть ненадолго. Переходим к отзывам. Отзыв ведущей организации.

**Олейников Владимир Александрович:**

*(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).*

Значит, ведущая организация – это Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук. Отзыв. Отзыв полностью положительный. Ну и начало. Открытие возможности флуоресцентного мечения целевых белков в живых клетках и организмах позволило сделать много важных фундаментальных и прикладных открытий в различных областях биологии. И хотя эта техника в целом уже не является новой, постоянное совершенствование технологий детекции и обработки получаемой информации расширяет ее возможности. Диссертация Божановой Нины Георгиевны посвящена изучению и созданию новых инструментов для флуоресцентного мечения белков *in vivo* за счет сочетания современных методов компьютерного анализа и исследования свойств модельных соединений с классическими и современными подходами экспериментальной биологии.

Диссертация изложена на 138 страницах, ну, и далее, значит, структура ее, обзор литературы – 3 части, 150 научных публикаций. Раздел в полной мере подготавливает читателя к дальнейшему изучению работы Божановой. Раздел «Результаты и обсуждение» содержит две части. Первая часть работы посвящена флуоресцентным белкам на основе вариантов GFP, содержащим триптофан в составе хромофора. В результате мутагенеза красного белка FusionRed диссертанту удалось получить две группы белков, обладающих желтой и оранжевой флуоресценцией, что не было описано ранее. Вторая часть посвящена работе со сравнительно новым семейством флуоресцентных меток — флуороген-активирующими белками. Диссертант поставила своей целью разработать протокол создания новых пар флуороген-белок, пригодных для мечения белков интереса *in vivo*. Ну, далее излагается то, что мы слышали сегодня. В целом, диссертационная работа представляет собой завершенное научное исследование, написана она тщательно, оставляет приятное впечатление.

К замечаниям можно отнести следующее. В конце главы первой обзора литературы уместным было бы заключение об основных современных тенденциях в области проведенного автором диссертации исследования, и обоснование выбранного на основе анализа литературных данных направления работы. На рисунке 40 не приведены разбросы, в тексте имеются опечатки. Однако сделанные замечания не влияют на общее положительное впечатление от работы и не снижают научной ценности полученных результатов. Полученные диссертантом результаты имеют как теоретическое, так и прикладное значение. Установление структур хромофоров новых флуоресцентных белков, изучение влияния разнообразных факторов на их спектральные свойства является важным шагом на пути к предсказанию свойств флуоресцентных белков по первичной аминокислотной

последовательности и рациональному дизайну флуоресцентных меток с желаемыми параметрами. Также для решения этой задачи представляется перспективным использование современных достижений компьютерного моделирования, уже зарекомендовавших себя в различных других областях.

Дальше список организаций, где рекомендуется применять результаты. Эти результаты в полной мере опубликованы в рецензируемых научных журналах, представлены на Российских и международных конференциях.

В целом проведенный анализ позволяет утверждать, что диссертация Божановой Нины Георгиевны соответствует, сама она, безусловно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология». Отзыв заслушан и утвержден на семинаре лаборатории фотобиологии Института биофизики Сибирского отделения Российской Академии наук, обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН. Отзыв подготовил заведующий лабораторией фотобиологии этого института, кандидат биологических наук Высоцкий. Отзыв утвержден директором этой организации Волковым Никитой Валентиновичем. Замечаний практически нет.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Нина Георгиевна, там было несколько несущественных замечаний, ваш выбор отвечать, не отвечать. Принимается с благодарностью, правильно? Константин Анатольевич, у вас есть возможность дать очередную характеристику.

**Лукиянов Константин Анатольевич:** Коллеги, я должен сразу сказать, что тут я выполняю некую формальную роль, руководство осуществлялось Александром Мишиным, здесь присутствующим, по формальным причинам я указан, но я осуществлял скорее такое совсем сверху руководство. Вот. Нина отличается потрясающей работоспособностью, проводила дни и ночи в лаборатории и, кроме всего прочего, она очень эффективный сотрудник, осваивает новые методы, включая всякие расчетные методы, которые в нашей лаборатории традиционно были не поставлены, и Нина их осваивала практически с нуля и, по-моему, достигла замечательных результатов. То место, где она сейчас стажировалась и где ее очень хотят взять дальше, это совершенно топовая лаборатория и по расчетам, и моделированию белков, и там ее очень высоко ценят сейчас. Я призываю Совет поддержать эту работу.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Есть ли отзывы на автореферат?

**Олейников Владимир Александрович:** Нет.



**Иванов Вадим Тихонович:** Стало традицией не реагировать на автореферат. Просто положено, и поэтому мы это делаем. Тогда переходим к официальным оппонентам. Мария Григорьевна Хренова, химфак МГУ.

**Хренова Мария Григорьевна:**

*(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).*

Добрый день, уважаемые коллеги. Во-первых, я еще раз хочу похвалить работу. Действительно очень большое, законченное исследование, и приятно видеть, то, что оно такое мультидисциплинарное, вроде как такие тенденции современной науки, чтобы не концентрироваться только на каком-то одном направлении или методе, а пробовать все объединять, и видимо, это дает более интересные результаты. Я здесь, наверно, больше отвечаю за ту часть работы, которая посвящена расчетному моделированию. Я не буду снова повторяться по поводу структуры диссертации, я думаю, тут уже все понятно. Конечно, работа больше экспериментальная, но, тем не менее, на самом деле расчетов тоже было много и разных. Больше, конечно, это все связано с докингом, с подбором правильных вот этих вот карманов для того, чтобы поместить туда флуорогены. Мне кажется, здесь с этой задачей диссертант справился очень хорошо, здесь, конечно, никаких замечаний быть не может. По поводу того, что связано с квантовой химией, тут чуть дела обстоят сложнее, собственно, здесь появляются мои замечания как раз уже. Чтобы долго не отвлекать, сразу уже к этой части перейду. Вот в автореферате было, здесь в докладе уже про это не рассказывалось... проведены расчеты... ситуация была такая... Здесь хромофор показан, и его пытались скручивать вокруг мостиковой связи и смотреть, как это влияет на спектральные свойства. Во-первых, не совсем понятно, зачем, в принципе, его сильно скручивать. Потому что, конечно, скрученная молекула обладает совсем другими свойствами, и вряд ли в белке она будет настолько скручена. И, также, все эти расчеты там были приведены на самом деле в газовой фазе и не очень понятно, как потом это все сравнивать с белковой... ситуацией в белке. И, также, там рассчитаны еще всякие спектры с уширением линий и совершенно ничего не сказано о том, как это сделано. Ну, и такие мелкие ещё замечания у меня есть по поводу терминологической путаницы. В тексте то присутствует «константа диссоциации», то «константа связывания», но на самом деле это все константа диссоциаций, судя по тому, что дальше про нее рассказывается. Возможно, это на самом деле связано как-то с тем, что, с одной стороны, изучается процесс связывания при этом, константа ингибирования это по сути константа диссоциации. То, наверное, здесь вот из-за этого произошли проблемы. Но из текста диссертации все равно все четко и ясно понятно, просто чуть поаккуратнее хотелось бы.



По поводу расчетов я сказала. Опять же терминологическая неточность: нельзя рассчитывать максимум полос поглощения, мы только можем рассчитывать вертикальные энергии электронных переходов. Наверное, это значение должно быть близко к максимуму полосы поглощения, но, честно говоря, никто из нас... это не обязательно, и об этом можно долго рассуждать. Ну и та фраза, которая уже была в отзыве ведущей организации, конечно, мне очень понравилась: «мечение белков интереса». Это, наверное, «proteins of interest», я так думаю, но по-русски звучит немножко забавно. Белки интереса - это хорошо. Но это все такие мелкие поправки, а в целом работа, конечно, очень хорошая, и мне было очень приятно ее почитать. Она очень аккуратно написана, очень хорошие иллюстрации, которые позволяют быстро разобраться в сути проблемы. Также у меня в отзыве написаны вот эти вот все требуемые слова, ну, и, собственно говоря, самое главное, что надо сказать, что диссертация соответствует всем требуемым Положениям о присуждении ученых степеней, соответствующим Постановлению Правительства, поправкам, изменениям к Постановлению Правительства, которые тоже требуется указывать. И, конечно, Нина Георгиевна, безусловно, заслуживает присуждения ей степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология». Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Нина Георгиевна, Вам слово. Отвечаем на замечания.

**Божанова Нина Георгиевна:** Спасибо за отзыв. Я думаю, вот эта иллюстрация вызвала большое количество вопросов. Отвечая на первый вопрос по расчету скрученных структур: для хромофоров... в белках для некоторых хромофоров показано наличие небольших скручиваний хромофора, которые при этом не препятствуют флуоресценции этих белков. Так как это компьютерные расчеты, мы хотели адресовать это скручивание, которое мы видим в нативных белках, однако непонятно, в каком месте надо прекращать эти расчеты, поэтому, не экономя компьютерное время, мы рассчитали все промежуточные стадии между цис- и транс- формами. Да, это немного избыточно, но, чтобы не делать искусственной границы где-то, где мы не знаем, где ее делать, были посчитаны все структуры.

Второй вопрос по поводу расчетов. Во-первых, расчеты были не в газовой фазе, а в ацетонитриле...

**Хренова Мария Григорьевна:** ...написано у вас в тексте диссертации...

**Божанова Нина Георгиевна:** В подписи даже было указано. Возможно, где-то я опечаталась, но действительно расчеты были сделаны в ацетонитриле. Ацетонитрил немного ближе к условиям, которые возникают в белковом окружении, однако, абсолютно экстраполировать эти данные, естественно, нельзя. Однако основная задача этих расчетов была не прямое сравнение с ситуацией в нативном белке, а сравнение этих хромофоров

между собой, имеют ли они все общие свойства или кто-то из этих конформаций все-таки имеет отличные свойства. И это мы увидели по нашим расчетам.

С другими замечаниями по поводу терминологических неточностей, да, я абсолютно согласна, они были допущены. В целом, в будущем я буду стараться аккуратнее проверять написанный текст и не допускать таких неточностей, и использовать меньше англицизмов. К сожалению, иногда встречается тоже. Ещё раз спасибо за отзыв.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Давайте послушаем Федора Васильевича Субача, лаборатория исследования мозга, Физтех.

**Субач Федор Васильевич:**

*(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).*

Всем добрый день. Я, пользуясь случаем, хочу поблагодарить Лукьянова, Нину Божанову и Мишина, других людей, принимавших участие в этой замечательной работе, за то, что она была нам представлена. Потому что это довольно трудно в наших условиях современных. Я хочу отметить актуальность исследования, потому что, безусловно, генетически кодированные метки, они открыли для исследователей возможность визуализации многих процессов и исследование их в динамике. Очень хорошим тому примером является работы Дженнифер Липпикотт-Шварц из НИИ. Однако разработанные флуоресцентные метки, они имеют свои недостатки и обладают рядом ограничений, что требует их дальнейшего улучшения, безусловно. Также появляются новые требования к меткам, например, флуоресценция во втором оптическом окне. Про первое оптическое окно уже... в принципе, сколько-то меток уже разработано, а вот для второго окна прозрачности в районе 1000 — 1400 нм я, честно говоря, не знаю таких флуоресцентных меток на основе генетически-кодируемых белков. Также здесь упоминалось о том, что метки на основе РНК, например, хорошо бы использовать. Но они, к сожалению, по разработчику даже, Грише Филонову, они имеют ограниченное все-таки применение, в основном используются для мечения транспортных РНК, потому что концентрация РНК в клетке маленькая, они быстро деградируют, нестабильны, и, к сожалению, их использовать для мечения эффективно не удастся. А также, почему актуальны еще эти метки, именно те, которые нековалентно связывают хромофор, потому что, они, во-первых, имеют очень высокую фотостабильность за счет того, что возможен обмен между метками, которые плавают в растворе и не повреждены после фотобличинга. И, во-вторых, они позволяют разработать новые подходы... использовать в новых подходах для микроскопии сверхвысоко разрешения, например, в Paint.

По поводу научной новизны. Она безусловна и обусловлена тем, что автор соединил экспериментальные методы с методами моделирования модельных соединений, анализ

модельных соединений и компьютерного моделирования, и впервые были получены новые флуоресцентные белки, желтый и оранжевый, имеющие в составе хромофора триптофан. Также впервые предложена структура их хромофора. Также были апробированы новые методы и подходы для компьютерного скрининга флуороген-активирующих белков, проведены *in silico* скрининг этих белков, проведен мутагенез *in silico* этих белков с целью превращения их во флуороген-активирующие белки. И успешность нового подхода была продемонстрирована на примере получения новых зеленых и красных флуороген-активирующих белков на основе бактериальных белков - липокалина B1c - и их успешность применения показаны *in vivo*.

Диссертация построена по традиционному плану и в целом, по моему мнению, оформление диссертации соответствует установленным требованиям.

Коротко. Обзор литературы состоит из трех разделов. В первом разделе описаны преимущества и недостатки двух основных существующих подходов по флуоресцентному мечению белков с помощью генетически кодированных и химических методов... меток. Во второй части обзора представлен анализ методов молекулярной эволюции белков с помощью случайного и сайт-специфического мутагенеза и *in vitro* рекомбинации. В третьей части обзора, с названием «Моделирование в биологии», рассматриваются подходы по созданию, по пониманию механизмов функционирования белков и созданию белков с новыми свойствами. Описано использование компьютерного моделирования для определения позиций мутагенеза, перспективных замен в белках, *in vitro* рекомбинации, дизайна белков, и даны рекомендации по использованию многочисленных компьютерных программ и онлайн серверов для разработки белков. В целом обзор литературы написан ясно, хорошим научным языком и дает полное представление о проблемах и задачах данной области исследования.

Я, наверное, пропущу описание результатов и обсуждения, потому что я коротко это сказал в актуальности и новизне, и это было в докладе, и в отзыве ведущей организации... Поэтому я сразу приступаю, наверное, к незначительным замечаниям к данной работе. Шесть замечаний. Первое связано с опечатками, например, «конформация» вместо «конфигурация» и так далее. Следующие десять замечаний связаны с тем, что не указано обозначение структуры или отсутствует информация о концентрации в составе среды, буфера, или не указана другая специфическая информация, например, напряжение импульса, сайты рестрикции, по которым вставлялись гены или длины волн фильтров.

Третий ряд замечаний состоит из четырех, связан с использованием неточных выражений, например, «сравнимых» и «превышающих», «гораздо менее значительных» и так далее. Мне кажется, что лучше писать более конкретно, например, во сколько раз.

В первой части литобзора в качестве примера получения синего белка путем мутагенеза GFP с помощью замены 66 тирозина на другую ароматическую аминокислоту приводится, по моему мнению, ошибочно синий белок mTagBFP2. Также, мне кажется, неверно описан принцип аква клонирования. И другое замечание: непонятно, почему автор не может обессолить, например, ПЦР-продукт с помощью каких-то стандартных методов перед электропорацией.

В части «Результаты и обсуждения» обсуждается много раз квантовый выход, коэффициент экстинкции, но нигде не описано, какие стандарты использовались, при каком возбуждении, в каком буфере... Эти данные отсутствуют. Коэффициент экстинкции тоже. Я не нашел, каким образом они определялись.... И ещё одно замечание: непонятно, почему в случае триптофанового хромофора стэкинг-взаимодействие сдвигает максимум флуоресценции в синюю область, хотя для GFP-подобных белков считается наоборот. И для окончательного вывода о структуре триптофан-содержащего хромофора, мне кажется, не хватает данных по масс-спектрометрии. На странице 76 автор объясняет, что флуорогенность объясняется возможностью формирования нефлуоресцентного возбужденного состояния с переносом заряда. Однако, как в свободном, так и в связанном с белком состоянии это состояние может тоже стабилизироваться и поэтому не может быть причиной флуорогенности, по моему мнению. На странице 80 автор пишет, что «все это позволило существенно сократить количество тестируемых *in silico* и *in vitro* флуорогенов», но каких конкретно флуорогенов – непонятно. На странице 86 в последнем параграфе автор пишет, что предложенный выше скрининг не работает. Таким образом, вероятно, могли быть пропущены контрастные пары белок-флуороген. Наверное. Может быть, я не прав.

Следующее замечание по поводу выбора в качестве флуороген-активирующего белка B1c из *E.coli* уже был дан... прозвучал ответ во время доклада. На странице 92 автор пишет, что «наблюдаемое возрастание флуоресцентного сигнала в используемой системе скрининга, как мы уже выяснили, может быть вызвано двумя процессами». Выше это было описано как предположение, сейчас - как доказанный факт. Мне кажется это неправильным. По наличию флуоресцентного сигнала «было принято решение не использовать белок дикого типа в дальнейшей работе из-за возможных проблем, связанных, по-видимому, с высокоаффинным связыванием данным белком неустановленного вещества, например, из-за вероятности влияния на физиологию исследуемой клетки». Но отсутствие флуоресценции сигнала в случае других мутантных белков не означает, что они не связывают вещества в клетке.

И последние два замечания связаны с недостаточно, на мой взгляд, полным представлением данных, связанных с организацией свойств мутантов *in vivo*, но, мне

кажется, так как исследование такое многогранное, я считаю это незначительное, несущественное замечание.

Повторюсь, что все вот эти замечания несущественны, они не затрагивают ни значимость экспериментов, ни выводы работы, которой я даю самую высокую оценку. И в заключении, я, безусловно, считаю, что диссертационная работа Божановой Нины Георгиевны является законченным, актуальным, выполненным на высоком научно-методическом уровне исследованием. Все выводы, сделанные в работе, абсолютно соответствуют результатам, они опубликованы, что важно, в трех статьях, рецензируемых, представлены на различных конференциях. Стоит отметить полноту разработки, когда автор от дизайна с помощью компьютерного моделирования переходит к разработке уже готовых флуоресцентных меток и дальше успешно показывает их применение *in vivo*. Тематика диссертации соответствует специальности «Молекулярная биология», и диссертационная работа удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатской диссертации. Её автор Божанова Нина Георгиевна, безусловно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология». Спасибо большое.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Нина Георгиевна, Ваша очередь.

**Божанова Нина Георгиевна:** Спасибо огромное, Федор Васильевич, за Ваш отзыв. Я соглашусь со всеми замечаниями по поводу опечаток - да, действительно, были.

Часть пропущенной информации про концентрацию в исследуемых буферах - да, действительно, часть информации была упущена.

Что касается более существенных замечаний... О неправильном приведении примера в качестве mTagBFP – да, я согласна, действительно это была моя ошибка.

Относительно замечаний про неправильный механизм QuickChange - я не согласна с этим замечанием. В 2014 году... Действительно в методике, которая поставляется с этим китом и может быть найдена онлайн, механизм представлен как никирование... образование никированной плазмиды, которая дальше просто зашивается в *E.coli*. Однако в 2014 году был подробно изучен этот вопрос, и несколькими методами было доказано, что данный процесс QuickChange все-таки проходит через механизм образования линейного продукта, и дальше рекомбинации. Это не RecA-зависимая рекомбинация, что было также доказано. Она зависит от каких-то других белков, точно не показано, однако она усиливается при использовании плазмид, имеющих RecE- и RecT-белки, но она проходит по механизму рекомбинации.

Дальше, что касается констант... квантового выхода флуоресценции и коэффициента экстинкции, действительно, эти методики были не очень хорошо описаны. В качестве

стандартов было проведено сравнение с другими флуоресцентными белками, имеющими известный квантовый выход флуоресценции и коэффициент экстинкции, а также были проведены измерения относительно стандартов, таких как флуоресцеин и родамин G6.

Что касается стекинга и смещения стекинга в синюю область, это, к сожалению, просто было не очень корректное описание. Имелось в виду то, что, если мы ставим триптофан в белок, то спектр флуоресценции смещается в синюю область, если даже там был бы стекинг, то он бы сместился обратно чуть-чуть в красную область, но это была бы не оранжевая флуоресценция, это была бы зеленая флуоресценция. Да, я не очень корректно это описала, это может привести к недопониманию.

Что касается состояния с переносом заряда, в данном случае формирование состояния с переносом заряда может зависеть от полярности растворителя. Полярный растворитель может его стабилизировать, гидрофобный растворитель может дестабилизировать. Так как карман исследуемого белка изначально предназначается, скорее всего, для переноса гидрофобных соединений, то он довольно сильно гидрофобный, поэтому, когда лиганд попадает в карман, он попадает в другую среду. Мы не можем точно утверждать, что это именно изменение в состоянии с переносом энергии, которая отвечает за флуорогенность, но я считаю, что это один из вариантов, который можно рассматривать в качестве гипотезы до тех пор, пока мы не доказали это какими-то другими экспериментами.

По поводу замечания о том, что скрининг не работает. Я не могу категорично сказать, что скрининг не работает, я могу признать, что скрининг, который мы используем, он дает ложноположительные результаты, но мы ни разу не встретились с ложноотрицательными результатами. То есть, в результате этих скринингов мы, да, иногда тестируем те белки, которые в результате нам не дают искомым пар, но я сомневаюсь, что мы пропускаем какие-то пары, которые дают большое увеличение флуоресценции. Да, мы делаем больше работы, но, скорее всего, не пропускаем самые хорошие пары.

Что касается замечания по поводу того, что, если мы не видим никакой флуоресценции, это не означает, что данное вещество не связывает никаких соединений в клетке, я полностью согласна с этим замечанием. Однако я смогла исключить то, что для меня очевидно – если я вижу какую-то флуоресценцию до добавления флуорогена, я могу точно сказать, что какое-то взаимодействие существует, поэтому мы дальше не работаем с этими белками. В случае других белков, пока я не вижу каких-то признаков другого взаимодействия, я продолжаю с ними работать до тех пор, пока какие-то другие опыты не подтвердят, что, возможно, там есть тоже какие-то проблемы.



Я также согласна, что иногда использование цифровых значений вместо, «меньше», «более» было бы намного корректнее в данной работе, в следующий раз я учту эти замечания.

Не приведение части результатов для самой последней стадии уже улучшенных вариантов было обусловлено тем, что я хотела сфокусироваться на основной работе по разработке методики, и не очень сильно углубляться в подробные характеристики всех полученных белков.

Мне кажется, я ответила на все озвученные вопросы.

**Субач Федор Васильевич:** Да, спасибо большое. Очень все правильно отвечено. Я полностью удовлетворен.

**Иванов Вадим Тихонович:** Принимаются ответы на вопросы?

**Субач Федор Васильевич:** Да.

**Иванов Вадим Тихонович:** Понятно, спасибо. Значит, мы покончили с официальными оппонентами... в хорошем смысле покончили.. и переходим к общей дискуссии. Кто хотел бы выступить? Да, пожалуйста, Владимир Захарович.

**Плетнев Владимир Захарович:** Уважаемые коллеги, я довольно неплохо знаком с диссертацией, которую выполнила Нина Георгиевна. Диссертация мне очень нравится. Прежде всего, я хотел отметить очень удачный дизайн новых биомаркеров. Во-первых, это желтые и оранжевые белки на основе триптофан-содержащего хромофора. То есть вместо природного тирозин-содержащего хромофора здесь присутствует триптофан-содержащий хромофор. Если тирозин-содержащий хромофор имеет одно только флуоресцентное состояние, то триптофан-содержащий хромофор имеет три флуоресцентных состояния за счет изомерзации хромофора. И здесь открываются новые возможности дизайна новых флуоресцентных биомаркеров за счет целенаправленного изменения конформационных состояний самого триптофана. И вот это, как говорится, такое будущее направление создания новых хромофоров. Ну, что касается биомаркера нового поколения, это вот нековалентные комплексы липокалина с синтетическим хромофором, то я считаю, это новый шаг в развитии наших флуоресцентных меток. Ну, во-первых, здесь синтетический хромофор связывается с липокалином нековалентным образом и это предполагает... То есть, здесь заложена очень интересная идея – заставить нефлуоресцентный хромофор, который находится в свободном состоянии в растворе, флуоресцировать, когда он попадает и специфически связывается в полость какого-то белка, в данном случае это липокалин, липид-связывающий белок. И это предусматривает возможность быстрого обмена хромофора, который находится в полости и который выгорел (есть такой термин — фотобличинг), и который уже не может функционировать и не может специфически



связываться. Это предполагает очень быстрый обмен с активным хромофором, который находится в растворе, и этот активный хромофор, попадая в полость белка, начинает активно флуоресцировать, что предполагает возможность более длительного использования данного биомаркера при каком-то процессе, например во фьюжен состоянии с каким-то другим белком.

И что касается диссертанта, я полностью согласен с руководителем. Нина Георгиевна очень... Я имел возможность наблюдать ее на многих семинарах, наших, которые мы проводим с лабораторией биофотоники. Она очень активный, очень целеустремленный и трудолюбивый сотрудник. Меня еще поражает то, что помимо прекрасного знания биохимических методов она освоила еще довольно далекую область, область моделирования, используя очень сложную программу Rosetta. Эта программа известна в мире, используется для предсказания пространственной структуры белков по аминокислотной последовательности. Каждый год проходят соответствующие соревнования, где Rosetta неоднократно получала первые призы. И, в общем-то, освоение программы, которую Нина, по-видимому, освоила, находясь в Америке – это достаточно сложный процесс, сложное использование. Критерии выборки правильного положения здесь размыты. Хотя бы, достаточно вот такой трудный момент, как определить, каким концом хромофор, прежде всего, входит в полость, а дальше, если определили это направление, надо расположить хромофор правильно в этой области, соединить его со всеми связывающими функциональными группами. И здесь, судя по картинке, Нина сделала все очень правильно.

Ну и в целом, действительно, я призываю коллег поддержать эту диссертацию. Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо, Владимир Захарович. Кто еще хотел бы добавить? Я готов присоединиться и к оппонентам, и к выступающим насчет того, что работа, безусловно, отвечает всем требованиям. Призываю голосовать в поддержку этой работы. Единственное, хочу упомянуть. Я немножко некомфортно чувствую, когда смотрю на специальность: молекулярная биология. На мой взгляд, чистая биоорганика. И этот факт говорит о том, что отсутствует четкий критерий разделения биохимии, биоорганики и молекулярной биологии и хотел бы, чтобы диссертанты, когда они заявляют о желании здесь работать, сразу определялись, по возможности, в соответствии с названием нашего института. Вот, собственно, и все. Я понимаю, здесь, возможно, влияет желание сдавать один экзамен, а не другой экзамен, это какую-то роль играет, но, тем не менее, мне кажется, суть дела от этого не меняется. Границы размыты и это приводит иногда к ощущению дискомфорта. Прошу.

**Формановский Андрей Альфредович:** Два слова в дополнение к тому, что Вы сказали. Недавно мы принимали вступительный экзамен в аспирантуру по специальности «биоорганическая химия». Три вопроса в билете, из них два – это в чистом виде молекулярная биология. Последний вопрос да, действительно. Там витамины, молекулярные биорегуляторы, но первые два вопроса, таких основных – это в чистом виде молекулярная биология.

**Иванов Вадим Тихонович:** Это уже вопрос к составителям билетов.

**Формановский Андрей Альфредович:** Претензия была, что называется, в письменном виде сформулирована, но выяснилось, что таковы требования Министерства образования, которое программу эту формулировало. Я совершенно с вами согласен, что границы...

**Иванов Вадим Тихонович:** Границы размыты.

**Формановский Андрей Альфредович:** Границы размыты, да. И что-то надо с этим делать. Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Кто еще хотел бы выступить? Спасибо. Мы почти готовы голосовать. Я дам слово диссертанту, чтобы он свое заключительное слово сказал, потом будем действовать.

**Божанова Нина Георгиевна:** Спасибо большое. Я хотела бы поблагодарить в первую очередь моих фактически двух научных руководителей, Константина Анатольевича и Мишина Александра Сергеевича за то, чему меня научили, за то, что меня не ограничивали в том, чем я хочу заниматься, и всегда поддерживали в моих, иногда довольно сумасшедших, начинаниях.

Я хотела бы поблагодарить моих оппонентов за очень хорошие, интересные замечания, за тщательное чтение моей работы.

Я хотела бы поблагодарить моих коллег за интересно проведенное вместе время, за огромную поддержку во время работы. Особенно я хотела бы поблагодарить Баранова Михаила за помощь с работой и за помощь с оформлением документов, а также Татьяну Игоревну за огромную помощь в оформлении документов для защиты. Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Нам после голосования предстоит еще оценить проект заключения по работе. Давайте сразу до голосования посмотрим. Есть какие-то замечания по проекту заключения?

*(Проходит обсуждение проекта заключения, вносят предложения С.К. Завриев и Н.В. Бовин)*

**Иванов Вадим Тихонович:** Уважаемые коллеги, объявляется перерыв на голосование.

*(Проводится тайное голосование)*



**Иванов Вадим Тихонович:** Прошу внимания. Похоже, что счётная комиссия справилась со своей задачей.

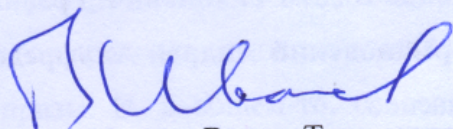
**Олейников Владимир Александрович:** Счётная комиссия отработала и, значит, по ходу... Слушалась защита Божановой Нины Георгиевны. Соответственно, присутствовало на заседании 22 члена Совета, роздано бюллетеней - 22, оказалось в урне - 22, «За» - 22, «Против» - нет, недействительных нет.

**Иванов Вадим Тихонович:** Есть возражения против утверждения этого голосования? Нет возражений. Утвердили.

*(Далее проходит голосование по проекту заключения диссертационного совета. Проект заключения принимается единогласно).*

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо, до следующих встреч!

Председатель диссертационного совета,  
д.х.н., академик РАН

  
Иванов Вадим Тихонович

Учёный секретарь диссертационного совета,  
д.ф.-м.н.

Олейников Владимир Александрович

