

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 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 (ИБХ РАН) по диссертации на соискание учёной степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 4 октября 2017 г. № 20

О присуждении **Божановой Нине Георгиевне**, гражданке Российской Федерации, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация “Разработка и изучение флуоресцентных меток методами моделирования и молекулярной эволюции белков” по специальности 03.01.03 (молекулярная биология) принята к защите 28 июня 2017 года, протокол № 17, диссертационным советом 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 (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15 февраля 2013 г.

Соискатель Божанова Нина Георгиевна, 1989 года рождения, в 2012 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «биохимия». С 2012 по 2016 гг. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время проходит стажировку в Университете Вандербильта (Нашвилл, штат Теннесси, США).

Диссертация выполнена в лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель - член-корреспондент РАН, д.б.н. **Лукьянов Константин Анатольевич**, заведующий лабораторией биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Хренова Мария Григорьевна, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник кафедры физической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;

Субач Фёдор Васильевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории стволовых клеток мозга Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН), г. Красноярск – в своём положительном заключении, подписанном к.б.н. Е.С. Высоцким, заведующим лабораторией фотобиологии, и утверждённом директором ФИЦ КНЦ СО РАН д.ф.-м.н. Н.В. Волковым, указала, что диссертация Божановой Нины Георгиевны соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), результаты работы вносят значительный вклад в развитие методов молекулярной биологии, предлагая новый подход к конструированию флуоресцентных репортеров для нужд современной биологии и медицины, а сам диссертант, безусловно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Соискатель имеет 8 опубликованных работ, в том числе 3 работы по теме диссертации объёмом 5,5 печ. л., опубликованные в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и/или Scopus. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Божанова Н.Г. внесла основной или существенный вклад:

1. Povarova N.V., Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Docking-guided identification of protein hosts for GFP chromophore-like ligands // J. Mater. Chem. C.– 2016.– Т. 4, № 14.– С. 3036–3040.

2. Н.В. Клементьева, Н.Г. Божанова, Е.В. Загайнова, К.А. Лукьянов, А.С. Мишин. Флуорофоры для локализационной микроскопии одиночных молекул. // Биоорганическая химия.– 2017, Т. 43, № 3, С. 227–235

3. Bozhanova N.G., Baranov M.S., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Mineev K.S., Golodukhina S.V., Baleeva N.S., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Yellow and Orange Fluorescent Proteins with Tryptophan-based Chromophores // ACS Chem. Biol. – 2017, doi: 10.1021/acschembio.7b00337.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.ф.-м.н. Хреновой М.Г., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). Есть некоторая терминологическая путаница: в тексте фигурируют термины «константа диссоциации» и «константа связывания», однако подразумеваются одни и те же величины. В частности вызывает путаницу утверждение: «Наиболее очевидной из всех исследованных является роль замены L132N. В обоих случаях (белок с одной заменой L132N и 16912, содержащий эту замену) мутанты по данному положению характеризовались более чем на порядок меньшей константой связывания с флуорогенами в сравнении с белком дикого типа. Это может объясняться, например, образованием аспарагином водородной связи с флуорогеном, стабилизирующей его в лиганд-связывающем кармане». На самом же деле в мутантной форме константа диссоциации ниже приблизительно на 1 порядок (или константа связывания выше), что соответствует лучшему связыванию. 2). Рис. 37А: Из текста работы остается непонятым, зачем было необходимо рассчитывать спектры в скрученной структуре. Какую информацию предполагалось получить из такого расчета. 3). Рис. 37В: Не совсем понятно, как энергии вертикальных переходов, рассчитанные в газовой фазе (согласно главе Материалы и методы), можно сопоставлять со спектрами поглощения в растворе. Также не ясно на основании чего были выбраны уширения при расчёте формы спектральной линии. 4). Терминологическая неточность: нельзя рассчитать «максимум полосы поглощения», можно оценить вертикальную энергию электронного перехода из тех расчетов, которые были проведены. 5). В тексте встречаются неудачные выражения и кальки с английского. Например «... для *in vivo* мечения белков интереса». Явно просматривается калька с английского «proteins of interest».

2. Отзыв официального оппонента к.х.н. Субача Ф.В., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). В качестве примера получения синего белка путем мутагенеза GFP с помощью замены 66 тирозина на другую ароматическую аминокислоту ошибочно приводится синий белок mTagBFP2. 2). Отмечены неточности в изложении методик, использование неудачных терминов и обозначений, ряд опечаток. Например, отсутствует информация о составе некоторых буферов и концентрации некоторых реагентов; стр. 44, Рисунок 19В - автор

неверно отражает принцип аква клонирования. 3). В части «Результаты и обсуждение», стр. 62, автор пишет, что «Однако даже гипотетический стэкинг в этих белках проявлялся бы в сдвиге их спектров эмиссии в синюю область спектра, и мы бы наблюдали зелёную, а не оранжевую, флуоресценцию.» Непонятно, почему в случае GFP-подобных белков, как зеленых, так и красных, стэкинг взаимодействия сдвигают максимум флуоресценции в более длинноволновую область (красную), а в случае триптофанового хромофора - наоборот в синюю область? 4). В части «Результаты и обсуждение», стр. 66, автор делает вывод о структуре триптофан-содержащего хромофора в белках. Здесь для окончательного вывода не хватает масс-спектрометрических данных. 5). Автор объясняет, что "флуорогенность объясняется ... возможностью формирования нефлуоресцентного возбужденного состояния с переносом заряда (ICT state)". Однако, как в свободном, так и в связанном с белком состоянии ICT state тоже может стабилизироваться и поэтому не может быть причиной флуорогенности. 6). В части «Результаты и обсуждение», стр. 86, последний параграф, автор пишет, что предложенный выше скрининг не работает. Таким образом, вероятно, могли быть пропущены контрастные пары белок-флуороген. 7). Непонятен выбор белка B1c в качестве основы для создания флуороген-активирующего белка. Почему отказались от белка ZNO2, который показал хороший контраст и на создание которого было потрачено столько усилий в предыдущей главе? 8). На рис. 45 используются слишком мелкие обозначения, затрудняющие восприятие. 9). Следует избегать использования не количественных терминов («меньший», «значимый» и т.д.) и заменять их на конкретные значения. 10). В части «Результаты и обсуждение», стр. 98-99, 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 не установленного вещества (например, из-за вероятности влияния на физиологию исследуемой клетки).» Да, но отсутствие флуоресцентного сигнала в случае других мутантных белков не означает, что они не связывают вещества в клетке. 11). Сравнение свойств мутантов белка 16912 недостаточно хорошо проиллюстрировано. Например, на стр. 112, в качестве доказательства большей яркости *in vivo* приводятся данные коллег, цитирую «Их данные тоже подтвердили превосходство улучшенного при помощи *in silico* моделирования мутанта.». К сожалению, на основании каких конкретно данных сделан вывод, не понятно, данные не представлены.

3. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). В конце Главы 1 (Обзор литературы) уместным было бы заключение об основных современных тенденциях в области проведенного автором диссертации исследования и

обоснованием выбранного на основе анализа литературных данных направления работы. 2). На Рис.40 не приведены разбросы. 3). В тексте имеются опечатки.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их достижениями в области создания и исследования биологических инструментов для изучения распределения, локализации и взаимодействия белков интереса в живых системах, а также применения различных методов компьютерного моделирования для этих целей. Это подтверждается, в частности, их работами в области получения и изучения флуоресцентных и люминесцентных белков, опубликованными в ведущих российских и международных научных журналах. Наличие опыта и высокой квалификации в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что соискателем получен ряд новых мономерных флуоресцентных белков, содержащих триптофан в составе хромофора и обладающих флуоресценцией в жёлто-оранжевой области спектра, для которых была предложена не описанная ранее структура хромофора. Кроме того разработан и успешно протестирован алгоритм поиска флуороген-активирующих белков.

Теоретическая значимость исследования состоит в демонстрации потенциала комбинации традиционных биологических подходов с различными методами небιологического моделирования для широкого круга задач, связанных с изучением и созданием флуоресцентных меток. В частности, в диссертации предложена новая стратегия поиска флуороген-активирующих белков, использующая компьютерное моделирование вносимых в аминокислотную последовательность белка замен и компьютерное предсказание взаимодействия белка с лигандом.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработанные в ходе исследования новые флуоресцентные метки уже успешно применены для флуоресцентного мечення белков интереса и их визуализации при помощи широкопольного и конфокального флуоресцентных микроскопов. При этом их меньший размер в сравнении с широко используемыми флуоресцентными белками может помочь исследованию особо чувствительных к модификациям белков, возможность “включения” и “выключения” сигнала за счёт добавления и удаления из среды лиганда может позволить использовать сразу несколько меток в одном канале флуоресцентного микроскопа, а естественный процесс связывания и диссоциации комплекса позволяет использовать данный тип меток для методов локализационной микроскопии одиночных молекул, не

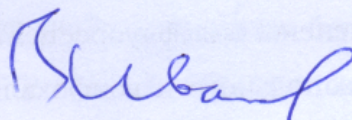
прибегая к облучению образцов светом высокой интенсивности. Информация о структуре хромофора новых флуоресцентных белков может помочь последующему их рациональному дизайну для улучшения имеющихся свойств или создания на их основе белков с новыми свойствами.

Оценка достоверности полученных результатов основана на том, что выводы базируются на результатах проверенных методик, полученные при помощи разных методов данные согласуются между собой, результаты получены с использованием сертифицированного оборудования и материалов.

Личный вклад соискателя состоит в планировании, постановке и анализе проведенных экспериментов. Основные эксперименты осуществлялись лично автором, за исключением органического синтеза, выполненного сотрудниками группы синтеза природных соединений ИБХ РАН; микроскопии сверхвысокого разрешения, выполненной в лаборатории флуоресцентного биоимиджинга НижГМА; ЯМР-анализа, проведенного Константином Минеевым в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН; расчётов термодинамических и спектроскопических свойств модельного соединения хромофора, осуществлённых Романом Гриценко из университета г. Лунд. При этом соискатель принимал активное посильное участие в планировании, подготовке и анализе всех экспериментов, проведенных другими специалистами. Подготовка публикаций также происходила при активном участии соискателя.

На заседании 4 октября 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Божановой Нине Георгиевне учёную степень кандидата биологических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.01.03 (молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за - 22, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

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



Иванов Вадим Тихонович

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



Олейников Владимир Александрович