

## ОТЗЫВ

официального оппонента  
на диссертационную работу  
Божановой Нины Георгиевны  
«Разработка и изучение флуоресцентных меток методами моделирования и  
молекулярной эволюции белков»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.01.03 – молекулярная биология

**Актуальность** исследования связана с постоянно развивающейся областью биоимиджинга и необходимостью разработки новых флуоресцентных меток с заданными свойствами.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы из 213 наименований. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста и включает 58 рисунков и 13 таблиц.

Во Введении обоснованы актуальность выбранной темы, рассматриваемые объекты – флуоресцентные белки и важность проведения мультидисциплинарных исследований, степень научной новизны и практическая значимость результатов и личный вклад автора.

В первой главе проводится обзор литературы и обсуждаются как объекты исследования, так и методы их изучения. Большое внимание уделяется флуоресцентному мечению белков с помощью олигопептидных или белковых конструкций, а также химических меток. Также приведены методы молекулярной эволюции белков. Отдельная часть посвящена роли моделирования в биологии, рассматриваются способы поиска замен в белках, приводящих к появлению требуемых свойств.

Во второй главе приведено описание материалов и методов исследования. Из этой главы становится четко видно разнообразие методов, использованных при выполнении работы: амплификация фрагментов ДНК, электрофорез, мутагенез, создание библиотек точечных мутаций трансформация бактерий, экспрессия и

очистка рекомбинантных генов, спектральные исследования, pH-титрование, компьютерное моделирование и другие.

Третья глава посвящена результатам работы и их обсуждению. В работе представлены разработанные и изученные флуоресцентные сенсоры с хромофорной группой, содержащей триптофан. Для полученных белков проведены спектральные исследования. Также для более детального изучения структуры хромофорной группы и ее свойств синтезированы и охарактеризованы органические соединения – аналоги предполагаемой хромофорной группы. Проведены дополнительные расчеты, интерпретирующие эксперимент. Далее рассматриваются результаты, полученные с использованием достаточно нового подхода, состоящего в подборе флуорофора и комплементарного ему белка для образования комплекса, в котором квантовый выход флуоресценции флуорофора будет выше, чем в растворе. Такие комплексы имеют большой потенциал так как при правильном подборе могут быть использованы в качестве флуоресцентной метки в живых системах. Автор проводит масштабный скрининг различных белков, содержащихся в базе данных PDB, а также мутантных форм одного из липокалинов для выбора наиболее перспективных с точки зрения связывания с флуорогеном методом молекулярного докинга. В результате выбираются и детально изучаются наиболее перспективные варианты.

Выводы диссертации научно обоснованы, имеют существенное практическое значение, поскольку относятся к актуальным биологическим объектам. Исследования Божановой Н.Г. позволили получить ряд новых перспективных флуоресцентных белков. Достоверность результатов Божановой Н.Г. определяется современным уровнем проведенных исследований, а также высоким уровнем опубликованных работ.

#### **Следует отметить некоторые недостатки:**

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».

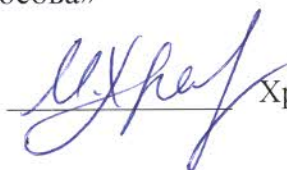
Тем не менее, приведенные замечания не снижают достоинства работы.

**Рекомендации по использованию результатов диссертации:** полученные результаты могут быть использованы в научных исследованиях, проводимых в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН.

**Заключение:** Диссертационная работа Божановой Н.Г. «Разработка и изучение флуоресцентных меток методами моделирования и молекулярной эволюции белков» является фундаментальным исследованием, имеющим как научное, так и практическое значение. Высокий уровень работы определяется применением современных экспериментальных и теоретических методов. Следует

особо отметить широту исследований – проведено комплексное изучение большого количества объектов. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации, выводы и заключение научно обоснованы. Работа соответствует требованиям “Положения 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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор – Божанова Нина Георгиевна – заслуживает присуждения ей степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент  
доктор физико-математических наук  
(02.00.17 – математическая и кантовая химия),  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории химической кибернетики химического факультета  
ФГБОУВО «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова»



Хренова Мария Григорьевна

Адрес: ФГБОУВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», химический факультет, кафедра физической химии, лаборатория химической кибернетики  
119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова  
Тел: +7(495)9392035, факс: +7(495)9328846  
E-mail: khrenova.maria@gmail.com  
Адрес в Интернете: <http://www.chem.msu.ru/>

Декан химического факультета  
ФГБОУВО «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова»,  
академик, профессор



Лунин В.В.