

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертационной работе **Божановой Нины Георгиевны** на тему

«Разработка и изучение флуоресцентных меток методами моделирования и молекулярной эволюции белков», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «молекулярная биология»

Актуальность исследования

Молекулярные основы функционирования живых систем являются ключевой проблемой фундаментальной и прикладной науки. Большинство важных открытий в этой области были сделаны методами, дающими статическую картину в один момент времени. Появление генетически-кодируемых флуоресцентных меток открыло возможность для визуализации процессов в живых системах и изучения их в динамике, давая практически полную картину изучаемых объектов и приводя к новому пониманию процессов, казалось бы, уже достаточно полно изученных статическими методами. Однако доступные флуоресцентные метки обладают рядом ограничений, требующих их дальнейшего улучшения. Появляющиеся новые методы, например, постоянно растущий набор различных вариантов микроскопии сверхвысокого разрешения, требуют разработки новых или адаптации к конкретному методу уже имеющихся флуоресцентных меток. Таким образом, разработка новых флуоресцентных меток и подходов для их разработки безусловно является актуальной задачей и диссертационная работа Божановой Н.Г. вносит существенный вклад в развитие этой актуальной области науки.

Научная новизна исследования

Работа Божановой Н.Г. посвящена разработке новых флуоресцентных меток и новых подходов для их разработки. Оригинальность и новизна данной диссертационной работы обусловлена тем, что автор соединил экспериментальные молекулярно-биологические подходы с анализом низкомолекулярных синтетических модельных соединений и компьютерным моделированием для разработки, создания и изучения новых флуоресцентных меток. Были получены два новых желтый и оранжевый флуоресцентных белка, содержащие триптофановый хромофор, и предложена структура их хромофора путем сравнения их физико-химических и спектральных свойств с синтезированными модельными соединениями. Были предложены и успешно апробированы новые подходы для компьютерного скрининга *in silico* как самих потенциальных флуороген-активирующих белков, так и для проведения *in silico* мутагенеза белка с целью превращения его во флуороген-активирующий белок. Успешность нового подхода была продемонстрирована на примере получения ряда новых зеленых и далеко-красных флуороген-активирующих белков на основе бактериальных белков ZNO2, 1PVS и липокалина B1c, связывающих синтетические аналоги GFP- или Kaede-подобных хромофоров флуоресцентных белков с увеличением флуоресценции. Полученные новые инструменты и подходы для их разработки открывают возможность для их дальнейшего использования другими лабораториями и разработки новых инструментов для флуоресцентной микроскопии.

Структура и содержание работы, достоверность и обоснованность научных результатов

Диссертация построена по традиционному плану, содержит основные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Материал диссертации изложен на 138 страницах и хорошо иллюстрирован с помощью 58 рисунков и 13 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 213 ссылок, включая оригинальные статьи, обзоры литературы и современные работы 2016 года. В

целом, оформление диссертации соответствует требованиям, установленным Министерством образования Российской Федерации.

В разделе «Введение» обоснованы актуальность и выбор темы диссертации, представлена научная значимость работы, сформулированы цели и задачи. Обозначена важность использования меток для изучения процессов, происходящих в живых организмах, и преимущество флуоресцентных меток по сравнению с другими. Обозначены нерешенные и актуальные задачи, связанные с созданием идеальной флуоресцентной метки и пониманию основ работы существующих меток.

Обзор литературы состоит из трех разделов. Первый раздел описывает преимущества и недостатки двух основных существующих подходов по флуоресцентному мечению белков с помощью генетически-кодируемых и химических меток. Наиболее детально проведен сравнительный анализ генетически-кодируемых меток, в качестве которых упоминается мечение с помощью коротких пептидов и белков, включая флуоресцентные, самомодифицирующиеся, флуорофор-связывающие и флуороген-активирующие белки, а так же включение в полипептидную цепь неприродных аминокислот. Автор делает важный вывод, что на сегодняшний день основным методом флуоресцентного мечения живых систем является область генетически-кодируемых меток.

Во второй части обзора представлен анализ методов молекулярной эволюции белков с помощью случайного и сайт-специфического мутагенеза и *in vitro* рекомбинации. Описаны ограничения, преимущества и популярность применения указанных методов для создания белков с заданными свойствами. Сделан важный вывод о том, что для *in vitro* мутагенеза самым используемым является “ПЦР с ошибками”. Упомянуты системы для *in vivo* проведения мутагенеза и селекции белков.

В третьей части обзора "Моделирование в биологии" рассматривается два основных подхода для понимания механизма функционирования и создания белков с новыми свойствами, а именно физико-химическое моделирование соединений и математическое моделирование с помощью компьютера. Описано успешное применение модельных соединений для понимания на молекулярном уровне свойств ДНК, катализа ферментов, посттрансляционной модификации белков, а так же состава и формирования хромофора флуоресцентных белков. Основным ограничением подхода с модельными соединениями автор считает использование упрощения, которое не всегда корректно для исследуемой системы. По второму подходу с компьютерным моделированием обозначены основные задачи при создании белков с новыми заданными свойствами и приведены отдельные примеры по их реализации. Описано использование компьютерного моделирования для определения позиций для мутагенеза и перспективных замен в белках, *in vitro* рекомбинации и дизайна белков. Даны рекомендации по использованию большого количества компьютерных программ и он-лайн серверов, таких как PyMol, LigPlot+, PLIP, FlexX, AutoDock 4, AutoDock Vina, Rosetta ROSIE, CASTp, FINDSITE, SiteHound, MODELLER, Swiss-Model, B-FITTER и FoldX, ConSurf, ANT, TopLib и ORBIT. Суммируя, автор делает вывод, что для создания белка, как эффективного биотехнологического инструмента, необходимо результат компьютерного моделирования дорабатывать при помощи описанных во второй части литобзора методов направленной эволюции.

В целом, обзор литературы написан ясно, хорошим научным языком, широко охватывает материал, включая самые последние публикации, и дает полное представление о проблемах и задачах в данной области исследования.

Раздел “Материалы и методы” дает подробное описание использованных в работе реактивов, оборудования и методов. Автор демонстрирует использование большого арсенала современных методов молекулярной и клеточной биологии, таких как: молекулярное

клонирование, выделение и очистка рекомбинантных белков, работа с животными клетками, широкоугольная и конфокальная флуоресцентная микроскопия, а так же флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения. Кроме того, стоит отметить использование автором компьютерных программ MODELLER, AutoDoc Vina и Rosetta для моделирования белков и докинга лигандов. Методический уровень диссертации, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Глава “Результаты и обсуждение” состоит из двух частей. Первая часть связана с разработкой и изучением новых спектральных вариантов флуоресцентных белков, содержащих триптофан в составе хромофора. Методом направленного и случайного мутагенеза красного белка FusionRed были получены желтый и оранжевый флуоресцентные белки FR66W-Yellow и FR66W-Orange, соответственно, оба содержащие триптофановый хромофор. Была подробно изучена роль обнаруженных в ходе случайного мутагенеза мутаций в этих белках. Для определения структуры триптофанового хромофора и спектральных различий между зеленым и оранжевым белками были детально изучены свойства флуоресцентных белков FR66W-Yellow и FR66W-Orange с помощью спектрометрии, денатурации, pH-титрования, изучения их фотоконверсии и сравнения физико-химических и спектральных свойств этих белков с синтетическими модельными соединениями. Анализ всех полученных данных и компьютерные расчеты позволили впервые установить, что оба белка содержат нейтральный кетонный триптофан-содержащий хромофор в определенной конфигурации.

Вторая часть работы посвящена разработке и изучению флуоресцентных меток на основе флуороген-активирующих белков. Вначале был проведен анализ физико-химических свойств библиотек GFP- и Kaede-подобных хромофоров, а так же их конформационно фиксированных аналогов. На основании этого анализа были выбраны флуорогены. Далее с помощью *in silico* скрининга среди 3000 белков *E.coli* был проведен поиск флуороген-активирующих белков. В программе AutoDoc Vina Все белки были проверены на возможность связывать аналог хромофора GFP и лучшие 500 белков были проанализированы на возможность взаимодействия с Kaede-подобными флуорогенами. В результате были выбраны четыре белка 3HO2, 1DOS, 2QRY и 1PVS в качестве потенциальных флуороген активирующих белков. Их гены были клонированы и проведен скрининг на предмет флуорогенности. Была обнаружена разная флуорогенность комплексов белок-флуороген и с помощью докинга в программе Rosetta было установлено, что недостаточная фиксация флуорогена в белковой молекуле может быть причиной худшей флуорогенности. Окончательно были отобраны два белка 3HO2 и 1PVS, связывающие Kaede-подобный хромофор с высоким субмикромольным сродством и увеличивающие его флуоресценцию более чем в 100-раз.

Во второй половине второй части автор в качестве матрицы для флуороген-активирующего белка выбрал белок липокалин B1c из *E.coli*. С помощью программы MODELLER был проведен *in silico* мутагенез липокалина с последующим *in vitro* анализом библиотеки из 20 мутантов на предмет возрастания флуоресценции при добавлении различных GFP-подобных флуорогенов. Наиболее контрастные пары белок-флуороген далее были охарактеризованы на предмет спектральных свойств, яркости, контраста и сродства белка к флуорогену. Было проведено изучение роли мутаций у двух лучших выбранных флуороген-связывающих белков. Самые перспективные пары белок-флуороген были протестированы на возможность использования *in vivo*. В результате, было продемонстрировано, что флуоресцентная метка на основе липокалина B1c может быть использована в животных клетках для мечения таких белков как, H2B, альфа-актина, виментина и кератина. Была обнаружена более высокая флостабильность флуороген-активирующих белков на основе B1c по сравнению с флуоресцентными белками EGFP и mKate. С помощью разработанных флуороген-активирующих мутантных белков B1c была продемонстрирована возможность их применения для микроскопии сверхвысокого разрешения. Далее был проведен случайный мутагенез лучшего флуороген-активирующего мутантного белка

B1c (16912). В результате дальнейшего скрининга случайных библиотек удалось найти мутанты белка 16912, имеющих улучшенную яркость и аффинность к лиганду. Однако улучшение яркости приводило к увеличению сродства к флуорогену, приводя к ухудшению фотостабильности. Альтернативно была предпринята попытка улучшить несколько мутантных флуороген-активирующих белков B1c с помощью *in silico* мутагенеза в программе Rosetta. На основе найденных в программе мутаций были заклонированы и охарактеризованы *in vitro* шесть мутантов. Таким образом, удалось создать ряд новых мутантных вариантов липокалина B1c с увеличенным квантовым выходом флуоресценции и контрастом. Улучшение свойств вариантов белка B1c, связывающих GFP-подобные флуорогены, было успешно подтверждено в экспериментах *in vivo* по визуализации клеточного цитоскелета с помощью флуоресцентной микроскопии. В заключение, был проведен скрининг *in vivo* мутантных вариантов липокалина B1c флуороген-активирующих далеко-красные производные хромофора с увеличенной системой сопряженных связей. Найденная лучшая пара белка 16912 с далеко-красным флуорогеном была успешно использована для визуализации структуры цитоскелета с помощью широкоугольной микроскопии в живых клетках.

Диссертационная работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». Все заключения и выводы достоверны и обоснованы и полностью отражают полученные научные результаты.

В целом, работа выполнена на самом высоком международном уровне, но вместе с тем есть ряд незначительных замечаний к представленной работе:

- 1) В первой части литобзора, стр. 11, первый параграф, 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, так как mTagBFP был получен из красного белка TagRFP, а не из зеленого GFP, и не путем замены аналогичного тирозина 66, так как на самом деле в позиции 66 в белке mTagBFP как раз присутствует тирозин, так же как и в исходном красном белке TagRFP.
- 2) В заключительной части литобзора, стр. 41, обозначение структуры 3, упоминаемое в тексте, отсутствует на рисунке 18.
- 3) В части «Материалы и методы», стр. 42, отсутствует информация о составе 10x буфера смеси ПЦР и трис-ацетатного буфера, а так же информация о концентрации этидий бромид.
- 4) На стр. 42, автор пишет, что использовался один из трех методов в зависимости, цитирую, «от настроения автора». Следует избегать подобных ненаучных терминов.
- 5) На стр. 44, Рисунок 19В автор неверно отражает принцип аква клонирования. Согласно описанию кита Quick Change (доступном в интернет), мутация вносится не за счет рекомбинации, и получается в качестве продукта ПЦР не приведенная на рисунке молекула, а никированная ДНК.
- 6) На стр. 45, фраза "... (возможность использования электрической трансформации сильно ограничена из-за высокого содержания солей в гибридизационном буфере)" не понятна, так как параграфом ниже при Аква клонировании написано, что «После очистки ПЦР-продукт растворяли в воде и использовали для химической или электрической трансформации бактерий».
- 7) На стр. 45, фраза «...полагаясь на *in vivo* рекомбинацию коротких гомологичных участков.» не верна, во первых, в мануале компании "Quick change site directed mutagenesis kit" написано, что происходит образование ДНК никированной, которая затем лигируется в бактерии. Речи о рекомбинации не идет, тем более, что обычно ДНК амплифицируют в бактериях, лишенных рекомбинационной активности.
- 8) На стр. 45, концентрация 100x полимеразы не указана.
- 9) На стр. 46, не указаны составы сред SOB и LB, а так же не указано, при каких оборотах в минуту проводили "... постоянное перемешивание", а так же отсутствует информация об объеме смеси и напряжении импульса при электрической трансформации.

- 10) На стр. 47, в предложении "...необходимый объем определялся из расчета 1 мл на 200 мл..." не понятно, 1 мл чего?
- 11) На стр. 47, упоминается, что «Для избежания размывания полос белки в геле фиксировали 3.5% раствором хлорной кислоты в 50% растворе этанола, ...». Хлорная кислота - это HClO_4 сильный окислитель. Я сомневаюсь, что это была она, наверное перепутано с HCl - соляной кислотой?
- 12) На стр. 47, написано, что "рКа хромофоров определяли прямым титрованием водного раствора соединения." Титрованием чем, не понятно.
- 13) На стр. 50, описывается, что "... фрагмент гена *b1c* был амплифицирован с использованием *E.coli* штамма K12 Rosetta-gami 2(DE3)pLysS в качестве матрицы ...". Нужно уточнить - это была выделенная геномная ДНК или суспензия бактерий.
Автор пишет, что "Конструкции FR66W-C165A-N, FR66W-Yellow-N и FR66W-Orange-mito были созданы при помощи рестрикции: ...". Правильнее было бы написать – «при помощи рестрикции с последующим лигированием».
Далее автор упоминает, что "Конструкции ... были получены при помощи самособирающегося клонирования, используя векторы *B1c*-pBAD, ...". Не понятно, между какими ПЦР фрагментами было перекрытие.
- 14) На стр. 51, описано, что "... ген мутанта белка *B1c*" был вставлен "в вектор actinin-TagRFP (Evrogen) вместо флуоресцентного белка". Не указано, по каким сайтам рестрикции вставлен ген *B1c*.
Ниже, при получении конструкции actinin-TagBFP-*B1c* правильнее писать "с помощью рестрикции с последующим лигированием", а не "... с помощью рестрикции: ...".
- 15) На стр. 51 и 52, при упоминании фильтров SB GFP-BP и SB DAPI-BP отсутствуют длины волн для фильтров. Для фильтров нужно указывать длины волн.
- 16) В части «Результаты и обсуждение», обсуждается квантовый выход и коэффициенты экстинкции. При определении квантовых выходов нигде не описано какие стандарты использовали, при каком возбуждении, буфере и т.д. При определении коэффициентов экстинкции не описано, каким методом они определялись.
- 17) На 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.» Не понятно, 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?
- 18) На стр. 66, автор делает вывод о структуре триптофан-содержащего хромофора в белках. Здесь для окончательного вывода не хватает масс-спектрометрических данных.
- 19) На стр. 75, в последнем предложении автор ошибочно употребляет термин «конформация», тогда как правильно говорить о «конфигурации».
- 20) На стр. 76, 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.
- 21) На стр. 80, автор пишет, что "Всё это позволило существенно сократить количество тестируемых *in silico* и *in vitro* флуорогенов." До каких конкретно флуорогенов удалось сократить - не понятно.
- 22) На стр. 86, последний параграф, автор пишет, что предложенный выше скрининг не работает. Таким образом, вероятно, могли быть пропущены контрастные пары белок-флуороген.

- 23) На стр. 87, опечатка в названии параграфа 4.2.2.4, написано "... различий в флуорогенности", должно быть исправлено на "... различий во флуорогенности...".
- 24) На стр. 90, В качестве основы для создания флуороген-активирующего белка был выбран белок B1c из E. coli. Выбор не понятен, почему отказались от белка ZNO2, который показал хороший контраст и на создание которого было потрачено столько усилий в предыдущей главе?
- 25) На стр. 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, а сейчас - как доказанный факт.
- 26) На стр. 93, Таблица 10, и ниже по тексту автор использует странное обозначение для максимального контраста, лучше было бы использовать обозначение $\Delta F/F_{\max}$.
- 27) На стр. 94, Рисунок 45, номера белков невозможно идентифицировать, даже при максимальном увеличении. Не понятно, какая структура соответствует, например, обозначению на рисунке GC11. Обозначение на рисунке 1165 не точное, возможно, предположить, что оно соответствует структуре M1165.
- 28) На стр. 95, опечатку «Связывание с флуорогенами происходили с ...» нужно заменить на «Связывание с флуорогенами происходило с ...».
- Автор пишет, что "Связывание с флуорогенами происходили с меньшей (микромольной) аффинностью." Предложением ниже так же используется для сравнения слово «меньшему». Последнее предложение на странице 95 содержит слово «намного слабее». Слова «меньший», «меньшему», «намного слабее» - не количественные термины, следует их избегать и лучше писать во сколько раз.
- 29) На стр. 93, Таблица 11, в колонке «Kd, мкМ» вместо n.d. правильное писать n/a, т.е. не применимо в данном случае, так как в случае свободного флуорогена не возможно измерить Kd.
- 30) На 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. Они теоретически могут связывать вещества, которые не приводят к изменению флуоресценции и этого не будет заметно по флуоресценции, и можно сделать неправильный вывод об отсутствии каких-либо взаимодействий в клетке. К тому же автор упоминает на стр. 85, что «... не любое даже высокоаффинное взаимодействие обязано приводить к возрастанию флуоресценции.».
- 31) На стр. 99, подпись к рисунку 48, вероятно опечатку «До после добавления ...» нужно исправить на «До добавления ...».
- 32) На стр. 100, флуоресцентный белок TagBFP был успешно присоединен как к N-, так и к C-концу мутантного белка B1c и был сделан вывод, что флуоресцентная метка "может быть успешно использована для мечения белков интереса с любой стороны.". В связи с присоединением дополнительного белка очень важно показать правильность локализации в клетке присоединенных к метке белков, например, таких как тубулин, актин, паксиллин и т.д., что и было показано ниже. Это уместно было бы упомянуть здесь, а иначе вывод не совсем корректный.
- 33) На стр. 100, при сравнении квантовых выходов используются выражения "сравнимых или превышающих" и "гораздо менее значительно". Таких неточных выражений лучше избегать и писать конкретно, во сколько раз.
- 34) На стр. 111, написано, что "... все проверенные белки продемонстрировали ... увеличенную яркость". Во сколько раз увеличилась яркость? Не понятно, на основании каких данных делается такой вывод. Из рисунка, на который есть ссылка, этого не следует.

Далее делается вывод, что "конструкции с белком 16912rnd1rnd1 ... не обладали высокой фотостабильностью." Данные по фотостабильности не представлены, хотя делается вывод. Не понятно, во сколько раз была хуже фотостабильность, нужно либо не делать вывод, либо приводить данные в виде таблицы, или рисунка, либо конкретных цифр в тексте.

В последнем абзаце сделан вывод о "гораздо большей яркости и контрастности в экспериментах *in vivo*" для флуорогенных комплексов. Во сколько раз большую яркость и контрастность имели комплексы? Данные не представлены ни в виде таблицы, ни в виде рисунка. Не понятно, на основании чего сделан вывод.

35) 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.

Ниже сделан вывод, что "Один из них — вариант 16912_F44A — продемонстрировал значительное превосходство над всеми ранее полученными мутантами во всех доступных нам видах флуоресцентной микроскопии." Вывод сделан, но данные не были представлены.

36) На стр. 114, упоминается "значимое увеличение флуоресценции флуорогена МКА-67" и "контрастность (около 10 раз)". В первом случае нужно указать, во сколько раз увеличивается флуоресценция, а во втором случае не приведена ошибка определения контрастности.

37) На стр. 115, автор обсуждает "... разницу в константах диссоциации комплексов...". Необходимо либо в тексте, либо в таблице привести значения констант диссоциации для упомянутых мутантов.

Ниже автор пишет, что "... несмотря на не очень высокую контрастность, ...". Нужно указать, контрастность во сколько раз.

Приведенные выше замечания к работе являются незначительными и не затрагивают ни значимость экспериментов, ни основные выводы работы, которой я даю самую высокую оценку.

Заключение о научно-практической ценности работы и соответствии ее требованиям ВАК

Диссертационная работа Божановой Н.Г. является законченным, актуальным, оригинальным, выполненным на высоком научном и методическом уровне исследованием.

Выводы, сделанные в диссертационной работе, соответствуют полученным результатам, которые были опубликованы в трех статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, а также представлены на различных научных конференциях в виде тезисов и научных школах и обучающих курсов в виде докладов. Не вызывает сомнений новизна работы и ее научная значимость. Стоит отметить разнообразие подходов, используемых в работе и полноту разработки, когда автор от дизайна с помощью современного компьютерного моделирования доходит до создания новых биотехнологических инструментов, таких как триптофан-содержащие желтый и оранжевый флуоресцентные белки и флуороген-активируемые белки и демонстрирует их успешное применение в животных клетках. Разработанные протоколы, сочетающие компьютерное моделирование и классические биохимические методы, а так же *in silico* скрининг, являются перспективными для применения в других лабораториях для дальнейших разработок новых биотехнологических инструментов для флуоресцентной микроскопии. Полученные в работе инструменты могут стимулировать появление новых вариантов флуоресцентной микроскопии. Созданные флуоресцентные метки могут найти практическое применение в медицине, например, для скрининга лекарственных препаратов.

Содержание Автореферата в полной мере отражает содержание диссертации.

Тематика диссертации соответствует специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Диссертационная работа удовлетворяет требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением 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 кандидатской диссертации, а ее автор, Божанова Нина Георгиевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник

лаборатории стволовых клеток мозга

Федерального государственного автономного

образовательного учреждения высшего образования

«Московский физико-технический институт

(государственный университет)»,

к.х.н

Субач Фёдор Васильевич

Субач

Адрес: 123098, г. Москва, ул. Максимова, д. 4;

Телефон: 8-968-962-7083;

e-mail: subach.fv@mipt.ru

Подпись к.х.н Субача Ф.В.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь МФТИ, к.ф.-м.н. Скалько Ю.И.

Скалько

