

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова Российской академии наук,

по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 20 октября 2021 г. № 10

О присуждении **Мяснянко Ивану Николаевичу**, гражданину РФ, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Производные хромофоров флуоресцентных белков как флуорогенные красители для белка FAST» по специальности 1.4.9 – «биоорганическая химия» принята к защите 18.06.2021 г. (протокол № 5) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997, Приказ Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013, а также Приказ Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.).

Соискатель Мяснянко Иван Николаевич, 1993 года рождения, в 2017 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности "Фундаментальная и прикладная химия".

С 2017 по 2021 гг. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. В настоящее время работает младшим научным сотрудником группы химии гетероциклических соединений отдела биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

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

Научный руководитель - кандидат химических наук Баранов Михаил Сергеевич, старший научный сотрудник, руководитель группы химии гетероциклических соединений отдела биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Ракитин Олег Алексеевич, профессор, доктор химических наук. Заведующий лаборатории полисераазотистых гетероциклов (№31) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН);

Аверин Алексей Дмитриевич, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры органической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН), г. Черноголовка, в своем *положительном* заключении, подписанном заведующим Лабораторией фталоцианинов и их аналогов доктором химических наук Пушкаревым Виктором Евгеньевичем, и утвержденном ВРИО директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Институт физиологически активных веществ Российской академии наук" кандидатом биологических наук Ключковым Сергеем Георгиевичем, отметила, что диссертационная работа Мяснянко И.Н. представляет собой завершённую научно-квалификационную работу и соответствует всем требованиям "Положения о присуждении учёных степеней", утверждённого 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; от 20.03.2021 г. № 426), предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени кандидата наук, а автор работы Мяснянко Иван Николаевич заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 - Биоорганическая химия.

Соискатель имеет 15 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 4 работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, объемом 2 печатных листа. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Мяснянко И.Н. внес основной или существенный вклад:

1. Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., **Myasnyanko I.N.**, Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. Red - shifted substrates for FAST fluorogen - activating protein based on the GFP - like chromophores // Chem. Eur. J. 2019. T. 25. № 41. С. 9592-9596.

2. Sokolov A.I., **Myasnyanko I.N.**, Baleeva N.S., Baranov, M.S. Convenient and Versatile Synthetic Protocol for Arylidene-1H-imidazol-5(4H)-ones // ChemistrySelect. 2020. T. 5. № 23. С. 7000-7003.

3. Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., **Myasnyanko I.N.**, Sokolov A.I., Baranov M.S. Synthesis of 2-arylideneimidazo[1,2-a]pyrazine-3,6,8(2H,5H,7H)-triones as a result of oxidation of 4-arylidene-2-methyl-1H-imidazol-5(4H)-ones with selenium dioxide // Chem. Heterocycl. Comp. 2020. T. 56. № 1. С. 116–119.

4. **Myasnyanko I.N.**, Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Yu., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov, M.S. Color Tuning of Fluorogens for FAST Fluorogen-Activating Protein // Chem. Eur. J. 2021. T. 27. № 12. С. 3986-3990.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.х.н. Ракитина О.А. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) В обсуждении результатов отсутствуют схемы синтеза соединений 9, 17, 20, 22 и 68. 2) В экспериментальной части отсутствуют спектральные данные для соединения 6f, с другой стороны нет сравнения полученных автором данных с литературными данными для известных соединений 1a, 1i и 1m. 3) Термин «более красные метки», на мой взгляд, является неудачным и его следует заменить на более точный.

2. Отзыв официального оппонента д.х.н. Аверина Алексея Дмитриевича Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1) На схемах в Обзоре литературы не указаны выходы соединений, что затрудняет анализ данных и препятствует сравнению с данными, полученными автором диссертации. 2) В Обсуждении результатов автором не проводится анализ различия в выходах целевых соединений, разброс которых зачастую весьма велик. Для читателя было бы интересно и познавательно узнать, чем обусловлено такое различие, тем более, что это является хорошо знакомой проблемой для каждого химика-органика. 3) В работе есть ряд терминов, которые не получили должной расшифровки и не совсем понятны читателю, не являющемуся специалистом в области флуоресцентной визуализации белков, а без пояснений они могут быть неправильно истолкованы. Например, выражение «генетически кодируемые метки», даже в пояснительной фразе «Новым типом генетически кодируемых флуоресцентных меток стали так называемые флуороген-активирующие белки» этот термин никак не проясняется. Таким же неясным термином является «хромофоры флуоресцентных белков». К этому же стоит добавить и термин «константа диссоциации», который используется для характеристики образующихся молекулярных комплексов флуорогенов с белком FAST. Является ли обратная ей величина обычной константой устойчивости? Почему автор оперирует именно такой величиной? 4) В Экспериментальной части можно было привести данные спектров поглощения, тем более, что очень значительная часть соединений была ими охарактеризована, как следует из Обсуждения результатов. 5) Выводы 3, 4 и 5 можно было сформулировать более содержательно, избегая таких неопределенностей, как «некоторые производные», «группа веществ», «направления для структурной модификации».

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

1) Сравнительно невысокие выходы реакций с участием диоксида селена (Схемы

2.6, 2.10) вероятно связаны, прежде всего, с протеканием побочных реакций окислительного ароматического сочетания, для которых особенно благоприятно наличие донорных гидрокси- и алкокси-групп в бензилиденовом фрагменте. Чем обусловлен выбор именно диоксида селена в качестве окисляющего агента? Проводились ли попытки оптимизации условий окисления бензильных заместителей (Схема 2.6) и получения циклических имидов (Схема 2.10) с использованием других окислительных систем? 2) В Таблице 2 автореферата допущены ошибки в названиях столбцов, содержащих значения максимумов в спектрах поглощения/флуоресценции, которые могут ввести читателя в заблуждение и затруднить оценку приведенных данных. В аналогичной таблице в диссертации (Таблица 2.2) данные ошибки исправлены. 3) Не совсем понятна формулировка первого абзаца п. 2.2.1, в котором объясняется мотивация выбора 4-гидроксibenзилидензамещенных имидазолонов как основы для поиска новых флуорогенов белка FAST. Ясно, что основа данной мотивации лежала в максимальном структурном подобии получаемых автором производных хромофоров флуоресцентных белков и известными роданиновыми флуорогенами белка FAST, содержащими гидрокси-группы. Однако, в использованной формулировке речь идет об отличиях, что несколько уводит от основной мысли. 4) Отличие соединений 10 и 11 (Схема 2.15) состоит лишь в строении фрагментов «Ag». Обычно, чтобы не вводить читателя в заблуждение, таким структурам дают один порядковый номер. Кроме того, по такой нумерации, если бы какое-либо соединение было получено по обоим представленным методикам, у него бы оказалось два разных номера. Автору следует учесть этот момент при оформлении публикаций. 5) В текст диссертации следовало бы добавить небольшие комментарии к вкладкам Б и В Рисунка 2.2 аналогично соответствующей вкладке А. Также краткую информацию о вкладках А, Б и В следовало бы поместить в подпись к Рисунку 2.2.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области органического синтеза и химии флуоресцентных красителей, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих научных российских и международных журналах. Стоит отметить, что сотрудниками ИФАВ РАН ведутся работы в области создания новых фотоактивных соединений класса фталоцианинов, изучения их физико-химических и фотофизических свойств, в том числе, с применением теоретических методов. Ракитин Олег Алексеевич является высококлассным специалистом в областях органической химии гетероциклических соединений, создании фотофизических материалов на их основе, а также медицинской химии. Среди важнейших достижений Аверина Алексея Дмитриевича стоит особо отметить синтез макроциклических соединений содержащих флуорофорные фрагменты, являющиеся потенциальными флуоресцентными сенсорами. Их высокая квалификация позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и

практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований были впервые синтезированы аналоги хромофора GFP с различным типом структур, которые демонстрируют эффективное связывание с флуороген-активирующим белком FAST, сопровождающееся многократным возрастанием интенсивности флуоресценции. Определены взаимосвязи между строением соединений, способностью связываться с белком FAST и свойствами образующихся комплексов. Впервые показана возможность использовать аналоги хромофора GFP в качестве флуорогенов для меченья структурных элементов живых клеток.

Теоретическая значимость работы подтверждается тем, что в ходе исследования было показано, что в результате введения акцепторных и сопряженных заместителей в бензилиденный фрагмент производных хромофора GFP могут быть получены соединения, проявляющие флуорогенную активность при взаимодействии с белком FAST, что расширяет представления о дизайне таких веществ. Также разработаны методы синтеза различных производных имидазолонов, данные о скрининге которых вносят важный вклад в понимание взаимосвязи между структурой соединения, его способностью связываться с белком FAST и флуоресцентными свойствами получаемого комплекса. А также эти данные позволяют предсказывать способность соединений флуоресцентно и селективно окрашивать различные внутриклеточные структуры.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что в результате проведённой работы впервые показана возможность использования производных хромофора GFP в качестве флуорогенных красителей, пригодных для селективного флуоресцентного меченья ядер и элементов цитоскелета в живых клетках, что может найти применение при исследовании происходящих внутри клеток процессов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные данные получены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, показана воспроизводимость результатов в различных условиях. Идеи и концепции, изложенные в диссертации, базируются на современных представлениях химической и биологической науки, не противоречат мировым литературным данным.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в процессе всех выполненных исследований, разработке и выборе экспериментальных подходов, а также анализе результатов экспериментов. Основные экспериментальные данные получены лично автором, за исключением регистрации данных ЯМР-спектроскопии (получены в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН) и исследования флуорогенных свойств полученных соединений на биологических

объектах (изучение проводилось в лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов и в группе молекулярных меток для оптической наноскопии – ИБХ РАН). Мяснянко И.Н. принимал непосредственное участие в написании и подготовке научных статей по теме диссертации к публикации, а также лично представлял результаты работы на конференциях.

В ходе защиты диссертации существенных критических замечаний высказано не было. Были заданы следующие уточняющие вопросы:

1) Чем можно объяснить различие в яркости для флуорогенов, содержащих пиридиновый заместитель и имеющих практически одинаковую структуру? 2) Могут ли полученные флуорогены быть использованы для флуоресцентных белков таймеров? 3) Изучались ли для флуорогенов спектры эмиссии или абсорбции при разных рН? 4) Какова природа флуорогенного эффекта на белке, есть ли спектральная зависимость от конформации? 5) В работе для поиска флуорогенов использовали метод библиотек, поэтому поиск был случайным? Теперь, когда стала известна нативная структура белка, планируется ли искать флуорогены, опираясь на структуру белка? 7) Делался ли QSAR анализ на основе структуры молекулы и каких-либо спектральных характеристик? 8) Были ли попытки денатурировать белок FAST, чтобы проверить разрушается ли хромофорный центр? 9) FAST - это уникальный белок?

Соискатель Мяснянко И.Н. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

1) Адекватно объяснить значительную разницу в яркости невозможно, разница состоит в различном значении коэффициента экстинкции, а данная величина является экспериментальной. 2) Могут, но для этого придётся удалить хромофор из флуоресцентных белков таймеров, чтобы образовалось пространство для связывания флуорогена. 3) Эксперименты по рН зависимости спектральных характеристик были проведены, эти данные не были включены в доклад, но в тексте диссертации присутствуют. 4) Этот эффект связан с фиксацией жесткой структуры флуорогена. 5) Да, поиск был случайным. Конечно планируется, чтобы получить ещё более красные флуорогены. 7) Нет, QSAR не проводили, но теперь его точно стоит провести, имея большой объём данных, который будет более точным и возможно найти какие-то другие флуорогенные соединения. 8) Нет такие эксперименты не проводились. 9) Нет, флуорогенных белков существует большое количество, но именно для белка FAST известны эффективные флуорогены.

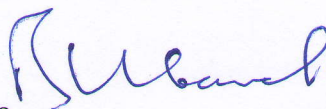
Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Мяснянко И.Н. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят важный вклад в развитие исследований в области органического синтеза, биоорганической химии и молекулярной биологии. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Мяснянко Ивана Николаевича «Производные хромофоров

флуоресцентных белков как флуорогенные красители для белка FAST», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением 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, 20.03.2021 г. № 426).

На заседании 20 октября 2021 года диссертационный совет постановил за решение научной задачи по созданию новых флуорогенных красителей для белка FAST, имеющих важное значение для развития биоорганической химии и изучения с их помощью проблем, касающихся разных аспектов молекулярной биологии и медицины, присудить Мяснянко Ивану Николаевичу ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человека, из них 8 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 1.4.9 – биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 23, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета



академик РАН
Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н.
Олейников Владимир Александрович

21 октября 2021 г.

