

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 20 февраля 2025 г. № 2

О присуждении Марынич Надежде Константиновне, гражданство Российская Федерация, ученой степени кандидата химических наук

Диссертация «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» по специальности 1.5.4. Биохимия принята к защите 16 декабря 2024 г. (протокол № 23) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк; от 10 февраля 2014 года №55/нк; от 30.09.2015 №1166/нк; от 13 марта 2019 года №222/нк; от 0.06.2021 №561/нк и 22 марта 2023 г. № 501/нк.

Соискатель:

Марынич Надежда Константиновна, 1995 года рождения, в 2019 году окончила Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова с присвоением квалификации специалиста по специальности 04.05.01 Фундаментальная и прикладная химия. С 2019 по 2023 гг. обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» по направления 06.06.01 Биологические науки. С 2019 года и по настоящее время работает младшим научным сотрудником лаборатории физической биохимии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного

учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»

Научный руководитель:

Савицкий Александр Павлович, Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»

Официальные оппоненты:

Горин Дмитрий Александрович, доктор химических наук, специальность 02.00.04 – Физическая химия, профессор по специальности биофизика, профессор центра фотоники и фотонных технологий автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий».

Субач Оксана Михайловна, кандидат химических наук, специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия (хим. Науки), старший научный сотрудник лаборатории нейронаук Федерального государственного бюджетного учреждения Национального исследовательского центра "Курчатовского института".

Выбор официальных оппонентов был обусловлен тем, что

-доктор химических наук Горин Дмитрий Александрович является одним из ведущих отечественных специалистов в области биофотоники, биосенсоров и тераностике раковых заболеваний;

-кандидат химических наук Субач Оксана Михайловна является одним из ведущих отечественных специалистов в исследовании флуоресцентных белков и создании сенсоров на их основе.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Марынич Н.К.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН), в своем положительном отзыве, подписанном доктором химических наук, профессором,

заведующим лабораторией фотосенсибилизации Кузьминым Владимиром Александровичем и утвержденном директором института, д.х.н., профессором Курочкиным И.Н., указано, что диссертационная работа Марынич Надежды Константиновны является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор Марынич Н.К. заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что ИБХФ РАН имени Н.М. Эмануэля имеет в составе несколько подразделений, занимающихся изучением флуоресцентных молекул, кинетики фотопревращений и биосенсоров. Таким образом, Сотрудники ИБХФ РАН имени Н.М. Эмануэля и, в частности, лаборатории фотосенсибилизации, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, связанные с тематикой диссертационного исследования Марынич Н.К.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы изложены в 4 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842.

1. Marynich N. K., Khrenova M. G., Gavshina A. V., Solovyev I. D., Savitsky A. P., First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment // Scientific Reports. – 2022 – Vol. 12(1). – P. 7862. IF 3,8
2. Марынич Н.К., Грановский И.Э., Савицкий А.П. Новые FRET-пары флуоресцентных белков для определения активности каспаз *in vitro* // Прикладная биохимия и микробиология – 2022. – Т. 58(6). – С. 592-597. IF 1,7
3. Марынич Н.К., Савицкий А.П. Определение «горячих точек» для улучшения созревания флуоресцентного белка moxSAASoti при 37 °C // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 3. С. 255–261. IF 0,78
4. Marynich N.K., Boyko K.M., Matyuta I.O., Minyaev M.E., Khadiyatova A.A., Popov V.O., Savitsky A.P. Single-point substitution F97M leads to in cellulo crystallization of the biphotochromic protein moxSAASoti // Biochemical and Biophysical Research Communications.

Результаты работы также были представлены на 7 российских и международных конференциях и опубликованных материалах конференций.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента, доктора химических наук, профессора по специальности биофизика, профессора центра фотоники и фотонных технологий автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» Горина Дмитрия Александровича (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. Стр.65, Рисунок 9. Калибровочная кривая гель-фильтрации на носителе Superdex 200 100/20 GL. У экспериментальных точек отсутствуют доверительные интервалы.
2. Стр.73, Таблица 9. Результаты характеристики олигомерного состояния хромопротеинов методами ГФ на носителе Superdex 200 и ДСР. Значение R приведены без значений абсолютной погрешности. Можно ли оценить абсолютную погрешность определения R, и как ее можно улучшить?
3. Стр.75-75 Время жизни флуоресценции TagRFP в сенсоре TR-23-U описывается биэкспоненциальной зависимостью (9). Имеет ли физический смысл константа c в зависимости (9)?
4. Стр.76. Таблица 11. Параметры времени жизни флуоресценции белка TagRFP в сенсоре TR-23U до и после инкубации с каспазой-3. При какой температуре проводились измерения? Как влияет температура на результаты измерений?
5. Стр.80, на трех их четырех зависимостей второй пик существенно меньше первого по амплитуде, в чем причина?
6. стр. 86, Рис 16, несоответствие подписи рисунка рисунку, в подписи есть А,Б,В,Г, на самом рисунке есть два рисунка А, и два рисунка В.
7. Стр. 89, Рис. 19. Чем обусловлен сильный шум на экспериментальных зависимостях?
8. Рис.22, Рис.27, Рис. 31, Рис.34 значения интенсивности флуоресценции приведены без погрешности.
9. Стр.110, Рис.40, А, Б, В отсутствует размерная шкала.

Замечания не носят принципиального характера и диссертационная работа Марынич Надежды Константиновны «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» полностью соответствует требованиям пунктов «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Отзыв официального оппонента, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника лаборатории нейронаук Федерального государственного бюджетного учреждения Национального исследовательского центра "Курчатовского института" Субач Оксаны Михайловны (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. В разделе Обзор литературы, главе 1.1.4.1. Метод случайного и сайт-направленного мутагенеза из фотоконвертируемых ФБ, с. 27 написано: “Новый вариант расширил границы применения ФТФБ, позволяя, например, использовать IrisFP для хранения четвертичных данных”. Непонятно, что такое “четвертичные данные”.
2. В разделе Материалы и методы, с. 52: “Буфер Б1 (гидрофобная хроматография): 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)”, а на с. 64: “Элюирование производили по схеме:
1.30% буфера Б
2.градиент 30-100% буфера Б.”
Буфер Б отсутствует в описании.
3. В разделе Результаты и обсуждение, глава 3.1, с. 75 написано: “Методами гель-фильтрации и ДСР показано, что полученный сенсор является димером, то есть оба белка в сенсоре находятся в мономерном состоянии.” На самом деле, результаты показывают, что сенсор является мономером.
4. В разделе Результаты и обсуждение, с. 86, Рисунок 16: на рисунке изображены 4 панели с названиями А, А, В, В, а в подписи к рисунку и в тексте описываются панели с названиями А, Б, В, Г.
5. В разделе Результаты и обсуждение, в конце главы 3.6, с. 108 написано: “Свободный белок и сенсор были экспрессированы в клетках HeLa для дальнейшего анализа.” Но в дальнейшем описание поведения белка и сенсора в животных клетках отсутствует.
6. В разделе Результаты и обсуждение проведена оценка олигомерного/мономерного состояния некоторых промежуточных белков moxSAASoti, но отсутствует оценка

олигомерного/мономерного состояния конечного бифотохромного белка moxSAASoti F97M/H74K и сенсора на его основе moxSAASoti F97M/H74K -23-Ultramarine.

Замечания не носят принципиального характера и диссертационная работа Марынич Надежды Константиновны «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» полностью соответствует требованиям пунктов «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Отзыв ведущей организации Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. Измерение кинетики образования и гибели красной формы после фотооблучения при 400 нм в растворах флуоресцентных белков было выполнено детектирование флуоресценции красной формы (569 нм). При обсчете кинетики использовано решение дифференциального уравнения для последовательной реакции с одним промежуточным продуктом, которое описывается с помощью 2-х констант k_1 и k_2 (уравнение 11, стр 81) Однако, красная форма образуется из фотовозбужденного синглетного состояния с временем жизни около 2 нсек, что соответствует константе $k_1=5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Эксперимент автора предполагает стационарное фотовозбуждение при 400 нм и псевдовидимость кинетики (20 сек) накопления красной формы экспериментах автора возникает в результате чрезвычайно большого времени жизни красной формы (около 100 сек), что и соответствует, измеренной автором константы $k_2=1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. На самом деле накопление красной формы происходит не за 100 сек, а в 100 раз быстрее-за 2 нсек. Таким образом, в эксперименте автора k_1 это аппаратная функция и константа k_1 физического смысла не имеет, эти константы можно не измерять и исключить из Табл 11 стр 82, и не обсуждать работе.

2. Автор дает таблице высокую точность определения экспериментальных констант k Для используемой в диссертации приборной базы эта точность на самом деле в хуже и составляет обычно для кинетических экспериментов такого рода в лучшем случае 10% (одна из причин отсутствие термостатирования кюветы с образцами при измерениях). В работе не указана температура, при которой проводили эксперименты, вероятно это была комнатная температура (в интервале 20-24 C). С

учетом большого времени жизни красной формы, эта реакция гибели красной формы имеет значительную энергию активации и в эксперименте следовало бы вести контроль температуры, так как без контроля температуры ошибка в определении константы изомеризации красной формы k_2 драматически возрастает

3. Расчет этих константы k_2 для наглядности следовало бы представить в виде зависимости $\lg I-t$ для доказательства мономолекулярного характера механизма гибели красной формы. При этом изменение в интенсивности флуоресценции должно быть минимум на порядок для большей точности k_2 , измерения в эксперименте следовало бы проводить с накоплением сигнала из нескольких измерений.

4. В диссертации следовало бы привести полный расчет фёрстеровского радиуса для системы изучаемой автором диссертации. Но в работе только приводятся общие принципы расчета Фёрстеровского радиуса из литературы делается предположение приблизительной оценка фактора $\kappa^2 = 2/3$, который характеризует зависимость FRET от угла между двумя хромофорами и может быть в интервале 0- 4. С учетом исследованного строения флуоресцентного белка, можно было попытаться оценить κ^2 более точно.

Замечания не носят принципиальный характер и не влияют на положительную оценку диссертации. Диссертационная работа Марынич Надежды Константиновны «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» полностью соответствует требованиям пунктов «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Плетневой Надежды Владимировны, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им академиком М. М. Шемякина и Ю А Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Отзыв Плетневой Надежды Владимировны замечаний не содержит.

Феофанова Алексея Валерьевича, доктора биологических наук, доцента заведующего лабораторией оптической микроскопии и спектроскопии биологических молекул, главного научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН). Отзыв содержит следующие замечания:

1. В разделе Материалы И методы много грамматических ошибок, присутствуют нерасшифрованные обозначения (буфер С, раствор П, режим 10/10), неполное по смыслу предложение («Для этого предварительно жидкую LB-среду...») и непонятное описание алгоритма расчета молярных коэффициентов поглощения новых вариантов белков
2. понимание текста с описанием оптической схемы установки для измерения кинетики фотопревращений без рисунка самой схемы крайне затруднено
3. утверждение, что «для создания пары «красный флуоресцентный белок-хромопротеин» необходимо выбрать пару с максимальным перекрытием спектров флуоресценции и поглощения», требует более точной формулировки;
4. утверждение, что время жизни (флуоресценции) отщепленного каспазой 3. белка TagRFP отличается 5,8 раза от TagRFP в составе интактного сенсора TagRFP-23-Ultramarine не корректно. на что однозначно указывают данные по τ_1 и τ_2 приведенные в таблице 2. Это некорректное утверждение зачем-то дублируется дважды до и после таблицы 2;
5. если молекулярная яркость это произведение молярной экстинкции в максимуме поглощения флуоресцентного белка на его квантовый выход флуоресценции, то в таблице 5 для этой величины потеряны три порядка;
6. по ГОСТу десятичные знаки должны отделяться запятой, в автореферате произвольно используется то запятая, то точка (например, таблицы 5 и 6);
7. на микроскопических изображениях (рис. 11) следует указывать масштаб.

Мухаметовой Лилии Инилевны, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника кафедры химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Отзыв Мухаметовой Лилии Инилевны замечаний не содержит.

Боченковой Анастасии Владимировны, кандидата физико-математических наук, доцента кафедры физической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Отзыв Боченковой Анастасии Владимировны замечаний не содержит.

С вопросами выступали:

1. проф., д.х.н. Бовин Н.В.
2. проф., д.б.н. Шумянцева В.В.
3. д.б.н. Топунов А.Ф.
4. д.б.н. Агафонов М.О.
5. проф., д.х.н. Дзантиев Б.Б.

В дискуссии приняли участие:

1. д.б.н. Шлеева М.О.
2. д.х.н. Еремин С.А.
3. д.б.н. Агафонов М.О.
4. проф., д.х.н. Дзантиев Б.Б.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты:**

1. Получен вариант moxSAASoti с заменами всех пяти аминокислотных остатков цистеина, характеризующийся повышенной скоростью фотоконверсии;
2. Найден оптимальный акцептор FRET пары - мономерный нефлуоресцирующий хромопротеин с высокими значениями интегралов перекрывания с донорами флуоресценции;
3. Замена F97M повысила яркость и фотостабильность красной формы moxSAASoti и позволила получить 3D структуру;
4. Замена H74K улучшила созревание moxSAASoti при 37 ° C;
5. FRET-пары moxSAASotiF97M/H74K-23-Ultramarine и TagRFP -23-Ultramarine позволяют детектировать активность каспазы 3 *in vitro* и могут использоваться в качестве флуоресцентных сенсоров;

Научная новизна работы:

SAASoti является уникальным бифотохромным флуоресцентным белком. Впервые он был обнаружен как фотоконвертируемый белок, затем были открыты свойства фотопереключения в диком типе белка. Это отличает его от других представителей бифотохромных белков, так как в них эти свойства были введены генно-инженерными методами. Ранее в нашей лаборатории была получена мономерная форма этого белка, успешно применявшаяся в методах PALM и ФКС. В этой работе впервые был получен бесцистеиновый вариант SAASoti, а также оптимизированы его свойства фотоконверсии и созревания при 37 ° C. Также подобран и охарактеризован мономерный акцептор флуоресценции – хромопротеин. Получена 3D структура одного из вариантов moxSAASoti.

Практическая значимость работы:

Понимание и рациональное управление свойствами ФБ является важным шагом для создания оптимальных генетически-кодируемых флуоресцентных меток. Создание мономерного и эффективного FRET-сенсора для применения в субдифракционной микроскопии и методе ФКС является началом в разработке скрининг системы для анализа динамики внутриклеточных процессов в живых клетках.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

Использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны и достоверность полученных данных не вызывает сомнений;

Выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя заключался:

- в получении основных результатов работы лично автором, либо при непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке основных публикаций по теме диссертации совместно с соавторами и научным руководителем автора.

Заключение

Диссертация Марынич Н.К. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследований, использованием большого набора современных методов, постановкой логически обоснованных задач, взаимосвязанностью сделанных выводов и полученных результатов. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в публикациях в ведущих журналах (4 статьи). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и представляет интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

На заседании 20 февраля 2025 года диссертационный совет принял решение присудить Марынич Надежде Константиновне ученую степень кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 12 докторов биологических наук, 7 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав диссертационного совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени - 20 человек,

«Против» - нет,

Недействительных бюллетеней – нет

Заместитель председателя диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

Доктор химических наук, профессор



Б.Б. Дзантиев

Ученый секретарь

Диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

Кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

«20» февраля 2025 г.