

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 ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 28 мая 2014 г. № 5
о присуждении **Билану Дмитрию Сергеевичу**, гражданину Российской Федерации,
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры окислительно-восстановительных процессов в живых системах» по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология принята к защите 19 марта 2014 г., протокол № 2 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, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10; Приказ Минобрнауки России от 15 февраля 2013 г. № 75/НК).

Соискатель Билан Дмитрий Сергеевич 1988 года рождения.

В 2011 году соискатель окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова. С 2011 г. по настоящее время обучается в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. С 2011 г. по настоящее время работает в должности «старший лаборант с высшим профессиональным образованием» в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в группе биологии активных форм кислорода

Научный руководитель – доктор биологических наук Белоусов Всеволод Вадимович, руководитель группы биологии активных форм кислорода Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. Черняк Борис Викторович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биоэнергетики клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.
 2. Воротников Александр Вячеславович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии Института экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации
- дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии имени А.Н. Баха Российской академии наук, г. Москва в своем положительном заключении, подписанном Савицким Александром Павловичем, доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией физической биохимии, указала, что полученные автором результаты обладают несомненной значимостью для науки, медицины и фармакологии, а сама работа по всем критериям отвечает требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям. Билан Дмитрий Сергеевич заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 4 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 4 работы общим объёмом 2,3 печатных листа, опубликованных в зарубежных научных изданиях, входящих в базу Web of Science, а также 2 патента РФ.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которых автор внес основной либо существенный вклад:

1. Markvicheva KN, **Bilan DS**, Mishina NM, Gorokhovatsky AY, Vinokurov LM, Lukyanov S, Belousov VV. A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2011; 19(3): 1079-1084.
2. **Bilan DS**, Pase L, Joosen L, Gorokhovatsky AY, Ermakova YG, Grabher C, Gadella TWJ, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV. HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. **ACS Chemical Biology**. 2013; 8(3): 535-542.
3. Mishina NM, Markvicheva KN, **Bilan DS**, Matlashov ME, Shirmanova MV, Liebl D, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV. Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a

genetically encoded fluorescent probe. **Methods in Enzymology**. 2013; 526: 45-59.

4. Bilan DS, Matlashov ME, Gorokhovatsky AY, Schultz C, Enikolopov G, Belousov VV. Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD(+)/NADH ratio changes in different cellular compartments. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. 2014; 1840(3): 951-957.

На диссертацию поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента Черняка Бориса Викторовича, отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- *in vitro* было показано, что сигнал биосенсора RexYFP изменяется при одновременном изменении НАД⁺ и НАДН, или при изменении НАДН в присутствии избытка окисленной формы кофактора. Можно заключить, что данный биосенсор направлен на измерение НАДН, а не соотношения НАД⁺/НАДН. И если биосенсор все же измеряет соотношение НАД⁺/НАДН, то автору следовало бы это прямо показать, сравнив, например кривую титрования НАДН при разных уровнях НАД⁺ в системе;

- в условиях ингибирования дыхательной цепи митохондрий на уровне комплекса I с помощью избытка ротенона (25 мкМ) автором было показано, что RexYFP регистрирует повышение НАДН в цитоплазме и матриксе митохондрий в течение 15-20 минут. Однако ранее было неоднократно показано, что ротенон при всех его побочных эффектах очень быстро повышает НАДН в клетках. В своей работе автор не комментирует этот факт и, таким образом, остается открытым вопрос о применимости RexYFP для кинетических измерений.

2. Отзыв официального оппонента Воротникова Александра Вячеславовича, отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- автор употребляет термин "полупериод окисления/восстановления". Обычно используют термин "период полувосстановления". На рисунке 17 опечатка: в формулах НАД⁺ и НАДН указана дезокситетроза вместо рибозы;

- в разделе 3.1.2 автор ставит вопрос о том, что различие периодов полуокисления исследуемых вариантов НуPer может быть связано с их разным сродством к субстрату или скоростью развития сенсорной реакции. В работе автор приводит лишь конечные результаты в виде рассчитанных значений. Каким образом автор смог разделить эти два параметра и индивидуально определить константы скоростей реакций НуPer с пероксидом? Имеют ли эти сенсоры разное сродство к субстрату? В расчетах автор использовал "наличие приблизительно 200-500-кратного градиента H₂O₂ через цитоплазматическую мембрану". Является ли эта величина экспериментальной или

расчетной?

- проверял ли автор возможность взаимодействия биосенсора RexYFP с ДНК, поскольку основу сенсора составляет транскрипционный фактор T-Rex, и влияет ли связывание ДНК на флуоресцентные свойства и/или локализацию сенсора в клетке? Кроме того, Rex формирует гомодимеры. Влияет ли это свойство на активность сенсора, и накладывает ли оно ограничения на его использование?

- как димеризация белковой части RexYFP сказывается на его флуоресцентных свойствах и ограничивает ли это применение сенсора в клетках? Как связаны эта димеризация и димеризация самого Rex-домена, влияют ли эти процессы друг на друга и изменяют ли они свойства сенсора?

3. Отзыв ведущей организации, составленный Савицким Александром Павловичем. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- автор проводил детекцию времени жизни флуоресценции только с помощью фазово-модуляционной техники, что значительно сузило возможности интерпретации данных, поскольку данный подход не позволяет проводить разложение многоэкспоненциальной кинетики затухания флуоресценции на отдельные компоненты;

- автору следовало бы провести оценку ложно-положительного результата срабатывания сенсора в результате колебаний количества FAD в живой системе, сопряженного с редокс-статусом клетки;

- автор изучает отклик сенсора только при добавлении H_2O_2 извне, более логичным выглядело бы построение физиологической модели стимуляции клетки и индукция естественного окислительного стресса и сравнение отклика сенсора с результатами измерения H_2O_2 независимыми методами.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их широкой известностью своими достижениями в данной отрасли науки, наличием большого количества публикаций в соответствующей сфере исследований. Их высокая квалификация позволяет объективно определить научную и практическую ценность диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований был создан мощный инструментарий для исследования некоторых ключевых окислительно-восстановительных событий в живых системах. Соискателем был усовершенствован созданный ранее генетически кодируемый флуоресцентный сенсор для регистрации H_2O_2 в живых системах NuPer и создан биосенсор RexYFP для регистрации

динамики изменения такого ключевого клеточного параметра, как соотношение $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ в цитоплазме и матриксе митохондрий живых клеток в режиме реального времени. Бианом Д.С. была разработана и применена стратегия использования сенсоров на основе кругового пермутанта желтого флуоресцентного белка (срYFP) в условиях значительных изменений величины рН в пределах физиологического диапазона.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что применение генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров на основе одиночного пермутированного флуорофора для микроскопии в режиме детекции времени жизни флуоресценции открывает широкие перспективы для изучения биофизики пермутированных флуоресцентных белков и для оптимизации свойств биосенсоров на их основе.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, результаты воспроизводимы в различных условиях, а методы исследования, предложенные и разработанные соискателем, прошли независимую экспериментальную проверку в некоторых других лабораториях, в том числе зарубежных.

Личный вклад соискателя состоит в участии на всех этапах процесса: в планировании и проведении экспериментов, анализе полученных данных, подготовке и публикации результатов исследований в научных журналах. Основные экспериментальные данные получены лично автором, за исключением получения трансгенной линии *Danio rerio*, экспрессирующей *HyPer-3*, выполненного в Karlsruhe Institute of Technology (Германия). Подготовка основных публикаций выполнена лично или при активном участии автора.

На заседании 28 мая 2014 г. Диссертационный совет принял решение присудить Биану Дмитрию Сергеевичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 6 докторов наук по профилю диссертации (специальность 03.01.03 – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени - 23, против присуждения учёной степени - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Зам. председателя диссертационного совета
член-корр. РАН

В.М. Липкин

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В. А. Олейников

