

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ РАН)

---

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

17 июня 2015 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Шемякиной Ириной Игоревной

«Красные и дальне-красные флуоресцентные белки, оптимизированные для  
мечения белков слияния»

по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Москва

2015 г.

## СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

17 июня 2015 года

Председатель диссертационного совета  
академик РАН

В.Т. Иванов

Учёный секретарь диссертационного совета  
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации – 6.

1. Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Академик РАН	Гришин Евгений Васильевич	(02.00.10)
3. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
4. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
5. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
6. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
7. Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
8. Член-корр. РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
9. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
10. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
11. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
12. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
13. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
14. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
15. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
16. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
17. Д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
18. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
19. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
20. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
21. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
22. Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
23. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)

**В.Т. Иванов:**

Есть одно беспрецедентное обстоятельство: диссертант первой защиты опаздывает.

**В.А. Олейников:**

А со второй можно?

**В.Т. Иванов:**

У второго все готово, поэтому я предлагаю начать с нее. Шемякина Ирина Игоревна. Если нет возражений. Оппоненты на месте и формальных оснований так не поступить у нас нет. Тогда давайте приступим.

**В.А. Олейников:**

(зачитывает документы из личного дела соискателя; отмечает, что объявление о защите диссертации размещено на сайте ВАК вовремя, все необходимые документы в деле есть).

**В.Т. Иванов:**

Есть какие-то вопросы, замечания по поводу материалов, личного дела? Обычно не бывает. В данном случае тоже вижу, нет. Тогда слово диссертанту, 20 минут для доклада.

**И.И. Шемякина:**

(излагает основные положения диссертационной работы).

**В.Т. Иванов:**

У кого есть вопросы? Прошу.

**С.М. Деев:**

Спасибо большое за очень интересный доклад. У меня 2 вопроса: хотелось бы услышать ваше мнение по поводу того, с чем связана цитотоксичность флуоресцентных белков? И перспективен ли ваш белок FusionRed, понятно что он оптимален для получения белков слияния, для получения стабильно трансфицированных клеточных линий? Спасибо.

**И.И. Шемякина:**

Спасибо. Нами были получены стабильно трансфицированные линии на основе белка FusionRed, эти данные представлены в тексте диссертационной работы, а цитотоксичность, наверное, обуславливается фолдингом белка, может быть, механизмами формирования хромофора белка.

**С.М. Деев:**

То есть вы не думаете, что это генерация синглетного кислорода, или что-то такое.

**И.И. Шемякина:**

Наверное, с этим тоже может быть связано.

**А.С. Арсеньев:**

У вас было показано на слайде. Я не уловил корреляции между числом пиков, которые вы наблюдаете на хроматограмме и мономерным состоянием вашего белка.

**И.И. Шемякина:**

Насколько нам известно, при высоких концентрациях белки склонны к димерному состоянию - по предыдущему опыту. Они дают 2 пика на хроматограмме, тогда как мономерные белки представлены 1 пиком.

**А.С. Арсеньев:**

Несколько раз вы упоминали, что отсеивали потенциально димеризующиеся структуры, а как вы их определяли?

**И.И. Шемякина:**

На основе кристаллической структуры белка mKate.

**А.С. Арсеньев:**

Расположенные внутри димера остатки – они являются потенциально димеризующими?

**И.И. Шемякина:**

Основываясь на данных кристаллической структуры, мы смотрели альфа-спиральную часть хромофора, различные аминокислотные остатки и внутренней замены.

**А.С. Арсеньев:**

Это ваши гипотезы, а экспериментально как проверяли?

**В.Т. Иванов:**

Что такое «внутренние»? Я не понял алгоритма отбора потенциально димеризующих структур. Несколько раз у вас звучало, что вы работали только с мономерными структурами, как вы это делали?

**И.И. Шемякина:**

Советовались с научным руководителем.

**В.Т. Иванов:**

Нужен более научный ответ. Я понял. Спасибо. Следующий вопрос.

**Р.Г. Ефремов:**

Вопрос тоже относительно димеризации. Почему считается, что лучше использовать мономерный белок?

**И.И. Шемякина:**

По экспериментальным данным, по литературным данным, мономерные флуоресцентные белки в составе белков слияния характеризуются правильной локализацией и функцией. Тогда как при аналогичных слитных конструкциях димерных белков наблюдается неспецифическая локализация.

**Р.Г. Ефремов:**

Когда вы анализировали полимерность контактов мономер-мономер вы сказали, что меняли ряд аминокислотных остатков, которые отвечают за слабую димеризацию. Как вы выясняли, какова свободная энергия димеризации, какие из них сильно влияют на димеризацию?

**И.И. Шемякина:**

В красных мономерных белках наблюдается остаточная димеризация при высоких концентрациях флуоресцентного белка. На анализе структур хромофора аминокислотных остатков.

**Р.Г. Ефремов:**

Это слабый димер?

**И.И. Шемякина:**

Да.

**Р.Г. Ефремов:**

Что это за остатки и на что вы их меняли?

**И.И. Шемякина:**

На слайде- две субъединицы белка mKate представлены по данным кристаллической структуры. И вот аминокислотные остатки 164,182 и 200 – это нумерация относительно GFP.

**Р.Г. Ефремов:**

Почему именно их выбрали?

**И.И. Шемякина:**

164й аминокислотный остаток может влиять на цис-транс изомеризацию хромофора. Это было наше предположение, которое подтвердилось экспериментально.

**В.Т. Иванов:**

Еще вопросы?

**А.А. Пахомов:**

Относительно давно был получен дальне-красный белок нобелевским лауреатом Тьеном на основе билирубина. Вы с этим белком не сталкивались?

**И.И. Шемякина:**

Изначально нет, но здесь представлены данные на 2010 года – на начало нашей работы. А на тот момент лучшими красными мономерными белками являлись уже мною перечисленные TagRFP, mCherry, mKate2.

**А.А. Пахомов:**

А сейчас не самые лучшие?

**И.И. Шемякина:**

Сейчас – нет.

**В.Т. Иванов:**

Дальше у нас отзывы. Сначала – на диссертацию, потом, если есть – на автореферат.

**В.А. Олейников:**

Поступили отзывы от ведущей организации - Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт общей генетики им.Вавилова.

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный).

Диссертационная работа «Красные и дальне-красные флуоресцентные белки, оптимизированные для мечения белков слияния» соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор Шемякина Ирина Игоревна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 –«Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре Центра коллективного пользования «Генетический полиморфизм» Отделения биологических наук Российской академии наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Вавилова. Отзыв подписан руководителем- доктором биологических наук Ребриковым Д.В. и утвержден директором Института общей генетики им.Вавилова доктором биологических наук профессором Янковским.

**В.Т. Иванов:**

Дмитрий Михайлович, можете охарактеризовать диссертанта, если есть такое желание?

**Д.М. Чудаков:**

Уже года два или три переключился в лаборатории на изучение иммунологии, ну вот работы еще продолжают выходить, наверное, одна из последних. Ирина пришла к нам в лабораторию уже достаточно давно и за это время было сделано очень много работ. Небольшая ее часть выплеснулась в тот кусок, который вы сегодня слышали. Эта часть исследований была очень тяжелой, пройти через эти многочисленные стадии, получить результаты. Человек очень упорный, жизнерадостный, в работе всегда. Сейчас, отвечая на вопросы, немного растерялась, перенервничала, но вообще это очень устойчивый человек. И уже, когда у меня руки опускались, она продолжала работать. Свои результаты она заслужила, ее упорство в дальнейшем должно ей помочь.

**В.Т. Иванов:**

Перейдем к слушанию официальных оппонентов. Профессор Соболев присутствует?

**В.А. Олейников:**

От Соболева поступил в письменном виде отзыв. Заслушаем присутствующих здесь?

**В.Т. Иванов:**

Да, здесь сказано, что он в командировке. Евгений Валерьевич тогда. Пожалуйста.

**Е.В. Шеваль:**

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный).

По актуальности, новизне, уровню выполнения и научной значимости диссертационная работа Шемякиной Ирины Игоревны «Красные и дальне-красные флуоресцентные белки, оптимизированные для мечения белков слияния», соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям. Диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология». Спасибо.

**В.Т. Иванов:**

Спасибо. Я, честно говоря, не уловил, есть ли необходимость защищаться диссертанту. Не было претензий, с которыми можно было бы поспорить. Тогда заслушаем второго оппонента.

**В.А. Олейников:**

Второй оппонент Соболев, он в командировке, к сожалению.

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный). В отзыве содержатся следующие замечания:

«Полученные автором белки оказались малотоксичны по тесту на эмбрионах *Xenopus laevis*. Хотелось бы, чтобы И.И. Шемякина привела основания, почему целесообразно было выбрать именно такой тест на токсичность, насколько выводы, полученные с его использованием, можно перенести на другие живые объекты.

Диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор Шемякина Ирина Игоревна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Подписано заведующим лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук доктором биологических наук профессором Соболевым.

**В.Т. Иванов:**

Было некое замечание. Прошу, отвечайте.

**И.И. Шемякина:**

Александр Сергеевич Соболев попросил объяснить, почему мы выбрали именно такой тест на цитотоксичность. Это довольно быстрый тест, модель *Xenopus laevis*. Снижение среднего размера глаз, который мы наблюдали, показалось нам достаточно легко измеряемым параметром, который будет показывать токсичность данных белков. И, поскольку, *Xenopus laevis* является многоклеточными организмами, нам кажется, что эти данные можно экстраполировать на другие живые модели.

**В.Т. Иванов:**

Понятно. Спасибо. У нас есть возможность перейти к общей дискуссии. Кто хотел бы поделиться впечатлениями?

**А.С. Арсеньев:**

Я бы хотел начать с небольшой перефразы. Если на клетке с мышками написано «лев» - то не верь глазам своим. В данном конкретном случае мы видим замечательные публикации, две из которых из серии Nature.



Очевидно, что была проделана огромная работа и логично, что автор поставил на первые места. Хотя там были и другие неплохие публикации. Но ответы на вопросы меня, честно говоря, не удовлетворили. И я не знаю, в чем причина. Либо слишком много успокоительных было выпито перед докладом, либо еще что-то. Например, человек сделал большую работу в коллективе авторов, потом авторы решили скинуться, а человек делал свою часть, а теперь, чтоб работа была законченная – как-то логично изложили. Может еще что-то. Для меня это странная защита, тем более ответы на вопросы. Может, это кто-то объяснит. Я буду голосовать, наверное, «против».

**Д.М. Чудаков:**

Хочется возразить: ситуации бывают разные и это не тот случай, который вы описали, безусловно. Эта работа полностью принадлежит диссертанту, она сама все это делала. Да, ответы на простые вопросы были слабые, но она их знает. Видимо было слишком много нервов и не сложилось. Следует признать, что это была сложная работа, большую часть инициативы по принятию решений, являются ли димеризующими, я принимал на себя. Мы работали вместе.

**С.М. Деев:**

Дорогие коллеги, мы, конечно, должны оценивать все интегрально, но в первую очередь работу. Работа блестящая, на мой взгляд. Я предлагаю отнестись к не совсем удачным ответам с пониманием, человек настроился, что будет выступать вторым, а выступал первым. Второе: не надо бояться представлять данные 2010 года. Их можно представить, но мне было бы интересно узнать, что происходит и в 2015 году, потому что для нас для всех это выбор дальнейшего объекта. В целом, работа фантастическая. Это очень конкурентная область, здесь работают и нобелевские лауреаты, огромное количество работ. Здесь трудно получить новые результаты, трудно нас удивить чем-нибудь, как нас и мировое сообщество. Мировое сообщество было удивлено: 2 статьи в Nature Group: Nature Communication и Nature Methods. В одной из них первый автор, в другой – второй, но равный вклад – стоит звездочка. Я буду голосовать «за» и других призываю. Те недочеты, которые были, я думаю, автор учтет в дальнейших работах. Спасибо.

**В.Т. Иванов:**

Спасибо. Диссертант имеет право на заключительное слово, если больше нет желающих выступить.

**И.И. Шемякина:**

Я хотела поблагодарить коллектив, с которым была выполнена диссертационная работа, научного руководителя, оппонентов. Спасибо за замечания и вопросы, которые были высказаны. Весь этот опыт постараемся учесть в дальнейшей работе. Спасибо.

(Проходит голосование и подсчёт голосов)

**В.А. Олейников:**

(оглашает результаты голосования)

Шемякина Ирина Игоревна. Присутствовало на заседании - 23 члена совета, роздано бюллетеней – 23, оказалось в урне бюллетеней – 23, «за» - 19, «против» - 2, недействительных – 2. Все в порядке, потому что больше, чем две трети состава проголосовали «за» принятие этой работы.

Председатель диссертационного совета  
академик РАН



В.Т. Иванов

Учёный секретарь диссертационного совета  
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников