

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

**Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН
7 июня 2023 года**

**Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Гаврикова Алексея Семеновича**

**по теме: Флуороген-активирующие белки для наноскопии
и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках**

Специальность 1.5.3 – “Молекулярная биология”

Москва – 2023

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 7 июня 2023 года.

Председатель
диссертационного совета

акад., д.х.н. А.И. Мирошников

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 8.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
3.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
4.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
5.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
6.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
7.	Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
9.	Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
10.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
11.	Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
12.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
13.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
14.	Академик РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(1.5.3)
15.	Д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
16.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
17.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
18.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
19.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Гавриков Алексей Семенович - “Флуороген-активирующие белки для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках”. Пожалуйста, Владимир Александрович.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:

Гавриков Алексей Семенович, гражданин Российской Федерации, окончил биофак МГУ по специальности биохимия. С 2019 года по настоящее время - младший научный сотрудник лаборатории оптического биоимиджинга в нашем институте. С 2017 по 2021 года аспирант ИБХ РАН. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология сдан с оценкой отлично. Работа выполнена в лаборатории оптического биоимиджинга нашего института. Научный руководитель - кандидат биологических наук, Мишин Александр Сергеевич, руководитель лаборатории. По теме диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 5 апреля 2023 года, и все необходимые документы в деле имеются.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Да, пожалуйста.

Соискатель А.С. Гавриков:

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо, вопросы. Татьяна Владимировна. Да, пожалуйста.

Д.х.н. Т.В. Овчинникова:

Спасибо большое, очень хорошая объемная работа. Я хочу поздравить Вас и Вашего научного руководителя. Работа красивая во всех смыслах. Мы с нетерпением ждем защиты докторской диссертации Александра Сергеевича. У меня два вопроса. Первый общий. Он к Вам, как к эксперту. Наверняка, с учетом бурного развития методов компьютерного моделирования молекулярной динамики были попытки создать белок *de novo*, который способен связывать и активировать флуоресценцию флуорогенов. Что Вы можете нам рассказать по этому поводу?

Соискатель А.С. Гавриков:

Действительно, такие работы проводились. Не у нас. Например, в лаборатории Бейкера, который является разработчиком программного пакета Rosetta и, который недавно разработал нейросеть, которая способна предсказывать функции белков, был разработан *de novo* бочонок.

Д.х.н. Т.В. Овчинникова:

Бета-бочонок.

Соискатель А.С. Гавриков:

Да, структура у него - бета-бочонок. Он способен связывать экзогенный хромофор и активировать его флуоресценцию. Такие работы были. Там есть несколько вариантов.

Д.х.н. Т.В. Овчинникова:

Квантовый выход.

Соискатель А.С. Гавриков:

Квантовый выход первых вариантов был небольшой. В десять раз менее яркий он был, чем EGFP, если я не ошибаюсь. А следующий вариант недавний уже сопоставим по яркости с флуоресцентными белками.

Д.х.н. Т.В. Овчинникова:

Интересно. А второй вопрос совершенно конкретный, можно 25ый слайд показать? Да, на мой взгляд очень непростая методическая задача - попеременное добавление хромофора и его отмывка. Можете поподробнее рассказать, как вы это делали?

Соискатель А.С. Гавриков:

Я собрал самодельный прибор для перфузии. Он состоял из дозаторов раствора. Было два дозатора. Мы использовали микроскопический слайд с входом и выходом, в нем сидели клетки. Мы на вход подавали пустой буфер. Второй дозатор подавал, соответственно, буфер с хромофором. В этот момент у нас хромофор добавляется, интенсивность донора падает. Здесь происходит отмывка хромофора из среды, то есть добавляется чистый буфер.

Д.х.н. Т.В. Овчинникова:

Спасибо

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо, еще вопросы? Пожалуйста.

Д.б.н. Д.А. Долгих:

Спасибо за интересный доклад, очень интересную работу. У меня небольшое замечание и вопрос. Замечание относится к пятому выводу, покажите, пожалуйста, на экране выводы. “Впервые в условиях флуоресцентной микроскопии показано взаимодействие белков”. Наверное все-таки не в условиях флуоресцентной микроскопии, а методом флуоресцентной микроскопии. Потому что структура белка определена в условиях рентгено-структурного анализа. Звучит странно. Понятно, что выводы изменить сейчас невозможно, но это же перекочевало и в заключение. Я предлагаю там в заключении это убрать. А вопрос связан с тем, что вы показали взаимодействие двух белков в живых клетках с помощью Вашего метода. В автореферате я увидел, что это взаимодействие было известно. Оно было показано каким-то методом. Первый вопрос - каким методом это было показано? И не могли бы вы сравнить те классические методы и Ваш метод. В каком случае Ваш метод мог бы быть преимущественно более интересным. Или для каких задач он мог быть более подходящим.

Соискатель А.С. Гавриков:

Спасибо за вопрос. К сожалению, я точно сейчас не вспомню, какими именно методами было показано взаимодействие. Но могу ответить, чем наш метод интересен. Он интересен тем, что в отличие от многих классических методов, которые связаны с выделением белка, с гель-фильтрацией и оценкой того, что получается при гель-фильтрации, какие белки выходят вместе, наш метод позволяет установить локализацию. В каком именно месте клетки происходит взаимодействие. С этой точки зрения флуоресцентная микроскопия и визуализация взаимодействия в клетке может быть более интересна для некоторых исследователей.

Д.б.н. Д.А. Долгих:

Спасибо.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Удовлетворены, Дмитрий Александрович?

Д.б.н. Д.А. Долгих:

Да, удовлетворен.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо, еще вопросы? Не вижу, спасибо. Теперь слово научному руководителю Александру Сергеевичу Мишину. Пожалуйста.

Научный руководитель, к.б.н. А.С. Мишин:

Здравствуйте, уважаемые коллеги. Чувствую большое удовольствие от того, что наконец Алексей Семенович смог вывести свою работу на защиту. Этот процесс затянулся и не по традиционной для многих причине, что не хватает результатов, а просто из всего объема тех результатов, которые Алексею удалось в нашей лаборатории с момента прихода студентом, создать, требовалось некоторая творческая работа по тому, как из этого скомпоновать диссертацию. Только часть, того что он успел сделать, работая в лаборатории, вошло в диссертацию. Я утром проверил, у Алексея сейчас вышло 18 работ в рецензируемых журналах. Это вообще для такого срока работы в институте в принципе очень достойный показатель. И это отражает одну из центральных черт, которая проявилась буквально сразу. Бывают такие люди, которые могут совмещать совершенно разные области. Алексей один из таких людей, которые с легкостью достигал совершенства и никогда не прощал себе промежуточный уровень мастерства. Всегда доходил до наилучшего владения методами, начиная от классических генно-инженерных, молекулярной эволюции. Тех вещей, которые в лаборатории были поставлены. И заканчивая всеми новыми вещами, которые его интересовали. Заканчивая нейросетями, компьютерными методами анализа. В общем. Бывают такие универсальные люди, которые могут сфокусировано и хорошо работать в нескольких областях знания, и мое счастье как научного руководителя, что такой аспирант оказался у меня. Это в принципе все, что я хотел бы сказать, поскольку роль научного руководителя в этот момент, это именно характеризовать, в общем, сейчас это не то, чтобы зрелый, это в самом соку научный

сотрудник, который может проявить себя, я надеюсь, наилучшим образом в своей дальнейшей научной деятельности. И я желаю ему существенной и внушительной научной карьеры. Спасибо.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо, Владимир Александрович, пожалуйста.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:

Начинаем с *заключения той организации, в которой выполнена работа*, а именно Институт Биоорганической Химии. Соответственно, биографические данные, они были оглашены уже. В 2017 году Гавриков закончил Московский Государственный Университет. Далее аспирант, соответственно, закончил аспирантуру в нашем институте. Научный руководитель только что выступил, Александр Сергеевич Мишин. Тема диссертационной работы утверждена ученым советом 8 октября 2019 года. И, наконец, был проведен семинар межлабораторный, открытый и по итогам обсуждения следующее заключение принято.

Во-первых, подчеркнута актуальность проблемы, в которой мы наверняка не сомневаемся, поскольку в прекрасном докладе все это прозвучало. И личное участие - основные результаты работы получены лично соискателем, были спланированы эксперименты по наноскопии в живых клетках, разработаны и протестированы FRET пары, *in vitro* и в живых клетках и так далее. Все результаты по наноскопии и исследованию FRET с модулируемым акцептором на основе липокалинов обработаны и интерпретированы самостоятельно соискателем. Далее идет подробное перечисление того, что было сделано.

Достоверность результатов, полученных в ходе данной работы не вызывает сомнений, подтверждается воспроизводимостью произведенных измерений и согласованностью результатов. Новизна и практическая ценность, ну тоже здесь все перечислены 6 пунктов. Они, в общем, соответствуют выводам диссертации, близки к ним. Да, 6 пунктов. Полнота изложения материала диссертации, изложены в работах опубликованных соискателем ученой степени, который соответствуют требованиям и, соответственно, список опубликованных по теме диссертации работ насчитывает 6. В рецензируемых журналах. Ну и, соответственно, в диссертации соблюдены все требования и она рекомендована к защите на нашем совете. Заключение подписано секретарем заседания Михаилом Сергеевичем Барановым и утверждено заключение

организации, где выполнена работа, директором нашего института Александром Габибовичем Габибовым. Это что касается заключения организации.

Теперь далее, у меня в руках *отзыв ведущей организации*, в качестве которой выступает федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Цитологии Российской академии наук. Ну и опять же, отзыв полностью положительный, актуальность темы выполненной работы совершенно четко обосновывается в этом заключении ведущей организации. Общая характеристика. Классическая стандартная схема: “обзор литературы”, “материалы и методы”, “результаты и обсуждение”. Текст изложен на 155 страницах, содержит 51 рисунок, 6 таблиц и 211 ссылок на использованную литературу. Введение, обзор литературы, хотя и краткий, дает достаточно хорошее представление об истории развитии метода флуоресцентного мечения, разнообразии существующих в настоящее время флуоресцентных меток. Материалы и методы содержат необходимую информацию по использованным в работе молекулярно-биологическим процедурам. Описаны выделение, очистка белков и так далее. Измерение эффективности FRET. Раздел “результаты и их обсуждение” содержит описание полученных экспериментальных результатов. Достаточно подробно все это рассмотрено. Научная новизна - в результате данной работы были найдены варианты липокалина, показавшие значительно большую фотостабильность относительно родительских вариантов. Достоверность. Опять же, подчеркивается, что все исследования проведены на высоком методическом уровне.

И вопросы и замечания. Замечаний по сути работы нет, достоверности полученных результатов, сделанных выводов. Замечания касаются оформления текста и отдельных неудачных фраз. Ну и далее перечисляются неудачные фразы. Во-первых, список сокращений. Очень хорошо, что такой список есть. Однако, большинство сокращений на английском языке, а расшифровка по-русски, и читателю может быть непонятно происхождение некоторых сокращений. Например, BODIPY. И тут, соответственно, по-русски написана некая расшифровка, которая не объясняет аббревиатуру. Некоторые расшифровки ничего не объясняют или крайне неудачны, например, латинское LOV, а по-русски - свет, кислород, вольтаж. Дальше LSS - расшифровка - длинный Стоксовский сдвиг. Фраза “появление новых методов, таких как например, локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения, основанная на регистрации вспышек флуоресценции отдельных молекул и расчета их математического центра накладывает определенные требования на используемую флуоресцентную метку,

которым обычные флуор белки не удовлетворяют”. И использование во введение термина - “вспышка” неудачно. На самом деле речь идет о световых импульсах, обусловленных единичными фотонами из определенных точек объекта, где локализован хромофор. Вспышка ассоциируется с чем-то совсем другим. Именно в силу этого, изображение точки, уширенной за счет эффекта дифракции, может быть заменено на точку в центре наблюдаемой на экране вспышки. Третье - обозначение символов, входящих в формулу, вводится с красной строки, словом “Где” с заглавной буквы. Четвертое - задачи исследования, страница 9, в пунктах 1 и 3 сформулированы не лучшим образом, хотя можно догадаться о чем идет речь - “в условиях флуоресцентной микроскопии одиночных молекул определить свойства вариантов липокалина, полученных в результате рационального дизайна на основе анализа кристаллической структуры и моделирования комплекса липокалин:хромофор”. Дальше в кавычках “Определить применимость систем биомолекулярной комплементации на носнове липокалинов для наноскопии в живых клетках”. Пятое - заголовок раздела 3.12.2 “по уменьшению времени жизни флуоресценции донора” на странице 72 выглядит очень странно. Список не слишком удачных выражений можно продолжить, большинство рисунков оформлены очень хорошо, но исключение составляет рисунок 40 на странице 124. Теперь, заключение - диссертационная работа Гаврикова Алексея Семеновича соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней. А сам он заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 молекулярная биология. Ну и, соответственно, отзыв рассмотрен на заседании лаборатории “структурной динамики, стабильности и фолдинга белков” Института Цитологии РАН и подписан главным научным сотрудником лаборатории “структурной динамики, стабильности и фолдинга белков” ИНЦ РАН, доктор физ.-мат. наук, профессор, Туроверов Константин Константинович. Соответственно, утвержден отзыв директором Института Цитологии, Томилиным.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо, поскольку диссертацию читали оппоненты, Александр Павлович, Вы все поняли в сокращениях? Пожалуйста, Вам слово.

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий:

Уважаемые коллеги, уважаемый председатель, я с Вашего позволения не буду зачитывать дословно.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Да, конечно.

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий:

Потому что был сделан прекрасный доклад. С моей точки зрения хорошо структурированный, очень четкий, логика вся построена абсолютно верно. Единственное, что я буду зачитывать строго - замечания.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Ну, Вы разобрались с сокращениями?

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий:

Ну, это понятно, да. Значит, во-первых, я хочу сказать, что работа действительно очень актуальная, очень интересная. Потому что, если говорить вообще об истории субдифракционной микроскопии, то вообще-то начиналась она с работ Мёрнера, который впервые отработал методы и показал, что можно видеть одну отдельную молекулу, фиксировать в пространстве. После этого стало понятно как это достигается. Это достигается за счет ухода в фемто объем, это должны быть фемтолитры, фемтолитровый объем. Только когда вы вводите детекцию, ограничиваете фемтолитровым объемом, тогда вы можете видеть одну молекулу. Не саму молекулу, но видеть сигнал, который идет от нее. А вот то, что можно увидеть положение одной молекулы, Мёрнер кстати вошел в список нобелевских лауреатов за субдифракционную микроскопию. А второй, можно сказать неудачник, он впервые показал, что вообще говоря, молекулу можно и зафиксировать с точностью до 1 нм, он даже дал название феномена. Когда он показал движение головок миозина вдоль актина, и показал, что действительно с точностью порядка 30-35 нм можно совершенно четко регистрировать. Связано это было с тем, что нужно просто видеть функцию распределения точечного источника. То, что видит микроскоп, техника и глаза - это фактически пятно внизу функции распределения. У функции распределения точечного источника есть вершина. Чтобы ее точно определить нужно набрать достаточно большое количество квантов. Ну чтобы определить с точностью порядка 1 нм нужно не меньше 1000 квантов на такую

единственную точку, и тогда можно действительно получать разрешение порядка 1 нм. Поэтому получилось, что вроде бы как задача решена. Вопрос только, как это приспособить к изображению и к микроскопу. Потому что решение Мёрнера сводилось к тому, что отдельную молекулу видеть можно. Вот, и тогда задача, если мы берем какой-то сложный биологический объект, то нужно попытаться постепенно по точкам увидеть все изображение точно. Наиболее четко и последовательно всю эту логику, и он ввел этот термин, *pointillism*, предложил Штефан Хелл, когда он работал со STED микроскопией. Вообще-то изображение в обычном микроскопе с хорошим объективом, в световом микроскопе, можно получить практически на уровне рентгеновского микроскопа, просвечивающего рентгеновского микроскопа. Но проблема состояла в том, как создавать вот эти разреженные облака. Потому что все хромофоры сидят очень близко друг к другу и у вас получается такое сплошное освещенное поле. Ну так уж исторически сложилось в истории науки, что первый опубликованный метод PALM строился на цветном белке, на белке Kaede. И, как ни странно, я уже даже не знаю почему, Штефан основные свои работы с демонстрацией метода тоже сделал на зеленом белке методом STED. Поэтому иногда возникает такая иллюзия, что цветные белки, только их и можно использовать в субдифракционной микроскопии. На самом деле нет, нужно научиться работать с точками и собирать эти точки. Просто, действительно, флуоресцентные белки при всех их недостатках, хочу сказать, очень много недостатков у цветных белков. Но у них есть одно преимущество, которое пока не смог превзойти ни один метод, включая тот, который докладывался сегодня. Он целиком генетически-кодируемый, эта метка. Его можно вводить и очень длительное время наблюдать в живом организме. Не обязательно только в клетке. Можно и за клеткой долго следить, можно и за живым организмом следить, за мышами. Наблюдать, что там происходит. Но задач очень большое количество, связанных с субдифракционной микроскопией, поэтому естественно, когда стали понятны вот эти основные причины, то естественно началась активная разработка разных новых подходов и методов. И вот автор этой диссертации, он сконцентрировался на *pointillism*-е, фактически тоже регистрации по точкам. Но попытался решить задачу, связанную с тем, что нужно набрать очень большую статистику. Не только цветные белки, любые хромофоры, в тех современных микроскопах, с которыми мы работаем, там очень мощные световые пучки. Поэтому горит все, включая и ваши метки. Они горят. Только у вас действительно обмен идет, и у вас постоянно вы фиксируете к объекту, вы фиксируете белок. А объект, который

флуоресцирует, он постоянно обновляется. Они точно так же горят, вылетают из этого белка, но тут же садятся новые. И поэтому это создает такую иллюзию фотостабильности и поэтому позволяет действительно получать достаточно большой быстрый набор квантов. Достигать хорошего разрешения при этом.

Второй момент, который автор тоже в общем-то начал активно анализировать, это не только наноскопия, но и FRET. FRET на самом деле, хотя это не очевидно, он сталкивается с той же самой проблемой, что и субдифракционная микроскопия. Все современные микроскопы с их мощными источниками света фокусированными, они жгут все метки. Поскольку FRET пары действительно сейчас одни из наиболее популярных - на основе цветных белков, они тоже все подвержены довольно сильной фотодеструкции. Причем, как правило, это два разных цветных белка, поэтому кинетика фотодеструкции у них разная. А поскольку динамический диапазон ответа там, как правило, довольно узкий - всего лишь десятки процентов, то возникает проблема точности. И вот один из вариантов, который предложен в данной работе, это как раз вариант с тем, что можно одну из меток отмывать, потом снова добавлять и таким образом более или менее точно определять эффективность FRET. Я не буду останавливаться подробно на структуре работы, потому что из доклада она следует достаточно четко. Единственное что, по поводу вещей связанных с замечаниями. Как раз при разборе FRET. Я хотел бы обратить внимание на одну довольно существенную вещь, зачитываю - “однако, автор не отличает диполь молекулы в основном или возбужденном состоянии от дипольных моментов переходов из возбужденного состояния в основное для донора и дипольного момента перехода из основного состояния в возбужденное. Эти дипольные моменты возникают только в момент поглощения кванта света”, они транзиторные. Собственно, картинка 4, которая приведена, автор ни разу не использует эти термины, переходные диполи, хотя именно они, их ориентация влияет на значение ориентационного фактора, именно они представлены на рисунке 4. И кроме того, еще один важный момент - для измерения времени жизни флуоресценции используется не просто счет одиночных фотонов, а скоррелированный счет одиночных фотонов, английская аббревиатура “TCSPC”, а в русской литературе традиционно принят термин “схема совпадений”. Я хотел немножко пояснить эту вещь. Всем кажется что счет одиночных фотонов, что это что-то страшно чувствительное. На самом деле счет фотонов всего лишь на 30% превосходит токовый режим, а вот скоррелированный счет фотонов, он еще менее чувствительный, потому что пропускается масса фотонов. Считаются только

скоррелированные фотоны, И поэтому эта проблема флуктуационности, набора статистики, она действительно актуальна, которую решил автор. И вообще, конечно, работа производит очень положительное впечатление. Но я сразу должен сказать, я не стал это подробно расписывать, но, зачитываю опять это замечание - следует отметить, что разработанные методы не являются универсальными, и работа только выиграла бы, если бы автор четко сформулировал области применения новых разработанных методов, при решении каких задач их следует применять. Могу тоже еще немножко пояснить, вообще говоря, здесь постоянно добавляется экзогенное вещество. И флуктуации его концентрации, которые будут постоянно происходить в зависимости от того, какая у вас длительность эксперимента. Сколько времени вы ведете эксперимент на клетках. Мы, например, иногда ведем эксперимент на клетках в течении суток, двух суток, трех суток. Не говоря уже о животных. На животных мы вообще ведем эксперименты месяц, приблизительно месяц. Здесь действительно достигнуты очень интересные, очень яркие результаты, в плане быстрого получения изображений с хорошим контрастом. Потому что, чем быстрее вы набираете статистику фотонов, естественно, тем быстрее вы получаете изображение субдифракционное. Ну и конечно же сам размер метки, здесь он тоже существенную роль играет. Потому что мы как-то привыкли считать, что GFP это практически такая ни на что не влияющая вещь. Но, наверное, никогда не надо забывать, что, вообще говоря, количество рибосом в клетке вполне фиксировано. И если мы ведем оверэкспрессию, мы очень много рибосом отбираем на свою метку. Равно как и разного рода трансферазы, которые переносят аминокислотные остатки для биосинтеза, их концентрация тоже ограничена. Поэтому далеко не всегда, когда мы увеличиваем такую генетическую нагрузку, все выглядит так просто. От первоначального восторга, что GFP - это прекрасно, мы теперь приходим постепенно к пониманию, что вообще-то говоря нужно все время роль ограничивать. Поэтому то, что автору удалось уменьшить размер генетической метки, это, я бы сказал, тоже довольно существенное достижение. И вместо 250 аминокислот нам хватает порядка 100. Это тоже в некоторых случаях может оказаться существенным. Работа очень сильно выиграла бы, если бы автор более четко сформулировал, на что, на решение каких задач стоит использовать эти методики. И опять, то что я обязан зачитать - по всем критериям диссертационная работа Гаврикова А.С. "Флуороген-активирующие белки для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках" соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением 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; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а ее автор несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо, Александр Павлович. Ну что, Алексей, давайте отвечайте.

Соискатель А.С. Гавриков:

Большое спасибо за объемным отзыв и комментарии. Я согласен со всеми замечаниями. На счет того, что я не очертил круг применения метода. Действительно, так как у нас лиганд экзогенный, применять этот метод можно только на клеточных культурах, причем в тех случаях, когда клетки у нас сидят монослоем. То есть какие-то более сложные системы, а тем более живые организмы, в них данные методы не применимы, так как невозможно добавить хромофор экзогенно.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Все? Спасибо Вам. Второй оппонент - Федор Васильевич Субач из Курчатовского центра. Пожалуйста.

Официальный оппонент, к.х.н., Ф.В. Субач:

Здравствуйте, уважаемый председатель ученого совета и коллеги. Меня работа Алексея Семеновича очень впечатлила, из нашей области разработки флуоресцентных меток, я впечатлен. И по поводу актуальности избранной темы, безусловно, визуализация клеточных структур с высоким разрешением, тем более в живых клетках в течении длительного времени, это очень сложная задача и безусловно имеющиеся флуоресцентные метки не удовлетворяют этим требованиям и также не разработаны FRET пары эффективные с модулируемым акцептором, тем более повторно активирующиеся. Которые позволяют визуализировать более достоверно взаимодействия между белком и белком. И также на их основе разработаны биосенсоры. Таким образом, работа Алексея безусловно вносит достойный вклад в область флуоресцентной наноскопии и разработки биосенсоров и визуализации белок-белковых взаимодействий.

По поводу научной новизны. Работа Алексея посвящена разработке флуороген-активирующих белков на основе липокалина для визуализации клеточных структур со сверхвысоким разрешением. Алексей убедительно продемонстрировал с помощью улучшенных версий липокалина двухцветную локализационную микроскопию и далеко-красную наноскопию клеточных структур в живых клетках. Также впервые на основе разработанной FRET пары с модулируемым акцептором, и способной к повторной активации, Алексей продемонстрировал взаимодействие между белками в живых клетках. Также он разработал сенсоры на основе найденной самой эффективной FRET пары, сенсоры на метилирование белков и на детекцию фокальных натяжений в живых клетках. И впервые Алексей с помощью найденной эффективной FRET пары показал наличие FRET сигнала, переноса энергии, на уровне одиночных молекул в живых клетках. Таким образом, полученные новые флуороген-активирующие белки и сенсоры на их основе открывают возможность не только визуализации клеточных структур со сверхвысоким разрешением, но и декретировать белок-белковые взаимодействия, метилирование белков и натяжение в фокальных контактах в живых клетках. Так как мне сейчас наиболее близки именно биосенсоры, то меня безусловно впечатлили эти новые биосенсоры. Работа имеет типичную структуру, я не буду это перечислять. В разделе введения как нужно все обосновано, актуальность и так далее. Обзор литературы написан очень детально и позволяет вникнуть, погрузиться в тему как раз исследований в области флуоресцентного мечения с помощью лиганд-связывающих белков. Также даются представления о локализационной флуоресцентной микроскопии. О резонансном переносе энергии FRET и способах его детекции. Также описываются применения FRET в различных биологических системах. И дается представление о сплит-вариантах флуоресцентных белков. Затем идет детальное описание различных классов флуороген-активирующих белков и новых синтетических хромофоров, подобных хромофору флуоресцентного белка GFP. И делается акцент на разработке производных липокалина и связывающих их хромофоров. И в конце литобзора дается структурное описание липокалина и применение его версий для визуализации различных клеточных структур. Глава “материалы и методы” тоже меня впечатлила. Особенно использование метода клонирования Golden Gate. Дальше здесь много стандартных, соответственно, методов, и конечно я отмечу применение сложного метода FRET сигнала в условиях широкоугольной и тем более локализационной микроскопии. Это безусловно методический уровень очень высокий. Ну и раздел “результаты и обсуждения”, он

имеет 6 частей, как уже несколько раз здесь было сказано. На первом этапе Алексей получил улучшенные версии, несколько улучшенных версий липокалина и охарактеризовал их свойства *in vitro*, такие, как яркость, сродство к хромофору и фотостабильность в животных клетках. На основе этих данных выбрал лучшие варианты и затем эти выбранные варианты он охарактеризовал фотостабильность в живых животных клетках с помощью локализационной микроскопии. В итоге он нашел самую лучшую систему мечения на основе липокалина и хромофора для наноскопии. На следующем этапе работы он продемонстрировал двухцветную зелено-красную наноскопию при визуализации цитокератина в живых клетках. На следующих этапах он разработал сплит-версию липокалина и с ее помощью успешно пометил и визуализировал волокна виментина. На следующем этапе он разработал дальне-красный вариант липокалина и успешно визуализировал структуру цитокератина. Опять же, в живых клетках и, опять же, с помощью локализационной микроскопии. На последнем этапе работы Алексей в результате скрининга различных FRET пар *in vitro* отобрал самую эффективную FRET пару с эффективностью FRET около 60-75% и показал в живых клетках работоспособность этой FRET пары и ее обратимость при мечении нуклеосом, гистонов. И также с помощью этой FRET пары ему удалось впервые зарегистрировать взаимодействие не только между гистонами в пределах нуклеосомы и молекулами виментина в филаментах, но и впервые между белками 14-3-3 и YAP1 в живых клетках. И на основе FRET пары были получены также биосенсоры, с помощью которых удалось успешно детектировать эпигенетическую модификацию хроматина и изменение натяжения в фокальных контактах живых клеток во время их движения.

Также был затем проведен поиск разных вариантов зеленых флуоресцентных белков самых ярких для комплекса DiB1:mka67 для наноскопии. Было показано, что именно mNeonGreen является самым оптимальным ярким флуоресцентным белком для этой пары. И, наконец, был продемонстрирован впервые FRET на уровне одиночных молекул. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертационная работа опубликована, как уже тоже было сказано, в 6 научных статьях, одна из которых, например в "Scientific reports", это "Nature publishing group", что говорит о высоком импакт факторе. В целом, работа безусловно выполнена на самом высоком научном уровне, замечаний к работе у меня нет. Кроме незначительных замечаний, по сути, это опечатки, орфографические ошибки. Они не имеют никакого отношения к сути работы. Безусловно диссертационная работа

Гаврикова Алексея Семеновича соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 молекулярная биология. Спасибо за внимание.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Коллеги, есть желающие выступить? Не вижу. Алексей, ну давайте, последнее, благодарности, и будем голосовать.

Соискатель А.С. Гавриков:

Спасибо большое за отзыв. Я бы хотел поблагодарить прежде всего своего научного руководителя, который вдохновил меня на развитие вообще в области не только биологической, но и в области программирования. Потому что, когда я пришел в лабораторию, я строил графики только в excel, и увидел, что все обрабатывают данные с помощью python. Вдохновился этим и сейчас успешно использую программирование для обработки данных более удобной и быстрой. Хотел бы поблагодарить Михаила Сергеевича Баранова за предоставление хромофоров и синтез, которые использованы в данной работе и собственно все хромофоры для *in vitro* скринингов были. Поблагодарить лабораторию рентгеноструктурного анализа за получение структуры комплекса липокалина с хромофором. Поблагодарить Нину Георгиевну Божанову, которая является автором самых первых мутантов локлина DiB1/2/3. Она тоже является коллаборатором по некоторым из опубликованных работ. Также хотел поблагодарить Евгения Георгиевича Максимова с кафедры биофизики МГУ за помощь в проведении одного из экспериментов, которые указаны в результатах диссертации. А также всех своих коллег, и коллектив, потому что коллектив нашей лаборатории и смежных лабораторий, с которыми мы общаемся, очень дружелюбный, очень приятный, и в такой атмосфере очень приятно работать и хочется продолжать работу в данном институте, в этих лабораториях, большое спасибо.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо, коллеги, голосуем.

(Проходит тайное голосование)

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Докладывайте результаты голосования.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:

Уважаемые коллеги, счетная комиссия завершила свою работу. И, соответственно, Гавриков Алексей Семенович. Присутствовало на заседании 20 членов совета, роздано бюллетеней 20, оказалось в урне 20, “За” 20, “Против” и недействительных нет.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Утверждаем? Единогласно.

Коллеги, остался еще один вопрос. Заключение, есть ли вопросы у ученого совета. Да, пожалуйста, Николай Владимирович.

Д.х.н. Н.В. Бовин:

(вносит предложение по незначительным стилистическим изменениям)

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников:

Решили, хорошо. Да, всем спасибо.

Председатель диссертационного совета
академик, д.х.н.



Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н.

Олейников В.А.