

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии имени 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 7.06.2023 г. № 15

О присуждении гражданину РФ **Гаврикову Алексею Семеновичу** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Флуороген-активирующие белки для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках» по специальности 1.5.3 – молекулярная биология принята к защите 04.04.2023 (протокол заседания №9) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 и действующим на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Гавриков Алексей Семенович, 17 ноября 1993 года рождения. В 2021 году соискатель окончил аспирантуру ИБХ РАН, в настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории оптического биоимиджинга отдела биофотоники ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории оптического биоимиджинга отдела биофотоники ИБХ РАН.

Научный руководитель - кандидат биологических наук, Мишин Александр Сергеевич, заведующий лабораторией оптического биоимиджинга отдела биофотоники ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Савицкий Александр Павлович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии, Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук и Субач Федор Васильевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярного конструирования, НИЦ "Курчатовский институт" дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург в своем *положительном* отзыве, подписанном Туроверовым Константином Константиновичем, доктором физ.-мат. наук, профессором, главным научным сотрудником лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков ИНЦ РАН, и утвержденном директором ИНЦ РАН, член-

корреспондентом РАН, доктором биологических наук Томилиным Алексеем Николаевичем, указала, что диссертационная работа Гаврикова Алексея Семеновича “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; 26.09.2022 г. №1690), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 6 работ общим объемом 9 печ.л. в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Гавриков А.С. внес основной либо существенный вклад, включают:

1. **Gavrikov A.S.**, Bozhanova N.G., Baranov M.S., Mishin A.S. Add and Go: FRET Acceptor for Live-Cell Measurements Modulated by Externally Provided Ligand // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, № 8. P. 4396.
2. Bozhanova N.G., Harp J.M., Bender B.J., **Gavrikov A.S.**, Gorbachev D.A., Baranov M.S., Mercado C.B., Zhang X., Lukyanov K.A., Mishin A.S., Meiler J. Computational redesign of a fluorogen activating protein with Rosetta // *PLOS Computational Biology*. 2021. Vol. 17, № 11. P. e1009555.
3. **Gavrikov A.S.**, Baranov M.S., Mishin A.S. Live-cell nanoscopy with spontaneous blinking of conventional green fluorescent proteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. Vol. 522, № 4. P. 852–854.
4. Muslinkina L.*, **Gavrikov A.S.***, Bozhanova N.G., Mishin A.S., Baranov M.S., Meiler J., Pletneva N.V., Pletnev V.Z., Pletnev S. Structure-Based Rational Design of Two Enhanced Bacterial Lipocalin Blc Tags for Protein-PAINT Super-resolution Microscopy // *ACS Chem. Biol.* 2020. Vol. 15, № 9. P. 2456–2465. (* - равный вклад авторов)
5. Bozhanova N.G., **Gavrikov A.S.**, Mishin A.S., Meiler J. DiB-splits: nature-guided design of a novel fluorescent labeling split system // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 11049.
6. Bozhanova N.G., Baranov M.S., Baleeva N.S., **Gavrikov A.S.**, Mishin A.S. Red-Shifted Aminated Derivatives of GFP Chromophore for Live-Cell Protein Labeling with Lipocalins // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, № 12.

На диссертацию поступили отзывы:

1. Отзыв оппонента Савицкого Александра Павловича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: соискатель 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. Кроме того, для измерения времен жизни флуоресценции используется не просто счет одиночных фотонов, а скоррелированный счет одиночных фотонов (TCSPC, а

в русской литературе – счет по схеме совпадений). Также оппонент указывает на то, что разработанные в диссертации методы не являются универсальными и соискателю следовало бы четко сформулировать области применения новых разработанных методов.

2. Отзыв Субача Федора Васильевича. Отзыв положительный, замечаний к представленной работе нет. Отмечается, что в диссертации присутствуют опечатки и орфографические ошибки, которые не относятся к научной сути работы.

3. Отзыв ведущей организации ИИЦ РАН. Отзыв положительный, не содержит замечаний по сути работы. Замечания касаются оформления текста и отдельных неудачных фраз, например, большинство сокращений в списке на английском языке, а расшифровка по-русски, и читателю может быть непонятно происхождение некоторых сокращений. Использование во Введении термина «вспышка» неудачно. На самом деле речь идет о световых импульсах, обусловленных единичными фотонами из определенных точек объекта, где локализован хромофор.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы (создание FRET биосенсоров, разработка фотоактивируемых и фотопереключаемых белков для наноскопии и измерения FRET, флуоресцентная микроскопия и микроскопия сверхвысокого разрешения), которые подтверждены сериями их публикаций в российских и международных журналах. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработана новая модулируемая FRET пара на основе флуоресцентного белка mNeonGreen в качестве донора энергии и комплекса липокалина DiB1 с хромофором mKa67 в качестве акцептора, позволившая многократно получать значение эффективности FRET путем попеременной отмывки и добавления хромофора и, тем самым исключить влияние количества меченого белка в клетке на измерения эффективности FRET; предложены новые варианты липокалина, обладающие в комплексе с хромофором M739 большей молекулярной яркостью, стабильностью плотности мечения и точностью локализаций в условиях наноскопии; создана эффективная система мечения, обладающая высокими показателями молекулярной яркости, стабильности плотности мечения и точности локализаций в условиях наноскопии. Также впервые была проведена двухцветная наноскопия структур в живой клетке с использованием генетически кодируемых меток за счет спектральных отличий комплексов хромофора M739 с флуороген-активирующими белками DiB3/F74V и DiB3/F53L; Были созданы системы бимолекулярной комплементации на основе липокалинов, обладающие большей молекулярной яркостью, стабильностью

плотности мечения и точностью локализаций относительно полноразмерных родительских липокалинов в условиях наноскопии;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что результаты проведенной работы демонстрируют потенциал липокаинового фолда для создания систем бимолекулярной комплементации на его основе. Также с помощью разработанной FRET пары на основе модулируемого акцептора было дополнено представление о взаимодействии белков YAP1 и 14-3-3, которое ранее не было визуализировано с помощью FRET методом флуоресцентной микроскопии в живых клетках.

Значение полученных соискателем результатов исследования **для практики** заключается в том, что полученные варианты липокалина можно использовать в длительной наноскопии живых клеток, изучая динамику внутриклеточных структур с субдифракционным разрешением. Разработанная FRET пара mNeonGreen-DiB1:mka67 может применяться для изучения внутриклеточных процессов с помощью создания биосенсоров на ее основе, а также для визуализации белок-белковых взаимодействий в живых клетках.

Достоверность работы сомнений не вызывает: исследования проводили с использованием современных молекулярно-генетических, клеточно-биологических и оптических методов; данные получены с использованием сертифицированного оборудования. Результаты исследований обрабатывали с использованием известных статистических подходов при помощи современных программных пакетов. Материал, представленный в работе, опубликован в зарубежных рецензируемых научных журналах.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, литературном поиске, получении экспериментальных данных, интерпретации полученных результатов, участии в апробации результатов исследования на российских и международных конференциях, подготовке публикаций. Соискателем лично проведено подавляющее число экспериментов, представленных в диссертации, за исключением: коллегами из лаборатории рентгеноструктурных исследований биополимеров ИБХ РАН была получена кристаллическая структура комплекса DiB3:M739, предложены конкретные аминокислотные замены в вариантах липокалина DiB1/V74F, DiB1/W139S, DiB3/F53L, DiB3/F74V, DiB3/F108L, DiB3/F53L/F74L/L129M и проведена *in vitro* характеристика комплексов этих липокалинов с хромофором M739; Божановой Н.Г. в центре структурной биологии университета Вандербильта (США) был получен кристалл димера DiB3, а также были предложены точки разрыва цепи для создания сплит-системы, проведена *in vitro* характеристика комплексов с хромофором M739; коллегами из лаборатории биофотоники ИБХ РАН проведена *in vitro* характеристика дальне-красного комплекса липокалина DiB1 с хромофором mka67, выполнено компьютерное моделирование варианта липокалина DiB-RM а также проведена *in vitro* характеристика комплексов DiB-RM и DiB-RM-сплит с хромофором M739;

Максимовым Е.Г. в лаборатории физико-химии биологических мембран биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова было проведено *in vitro* измерение изменения времени жизни флуоресценции FRET пары mNeonGreen-DiB1:mka67. Все хромофоры, использованные в работе предоставлены Барановым М.С., руководителем группы химии гетероциклических соединений ИБХ РАН.

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Гаврикова Алексея Семеновича является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена научно-практическая задача разработки системы прижизненного мечения для съемки внутриклеточных структур в условиях наноскопии, а также разработки новой модулируемой FRET пары, что вносит существенный вклад в развитие исследований в области молекулярной биологии. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты, а по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Таким образом диссертационная работа Гаврикова Алексея Семеновича «Флуороген-активирующие белки для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690). В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

- 1) Какие на данный момент существуют исследования в области создания *de novo* флуороген-активирующих белков?
- 2) Каким конкретно образом осуществляли циклическую отмывку и добавление хромофора в клеточную среду.
- 3) Какова область применения разработанной FRET пары?

Соискатель Гавриков А.С. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию.

- 1) Исследования в области *de novo* моделирования и создания флуороген-активирующих белков на данный момент очень популярны. Одним из примеров создания *de novo* флуороген-активирующих белков могут служить работы Дэвида Бейкера. В этих работах были созданы белки, по структуре представляющие собой бета-бочонки, которые способны связывать синтетические хромофоры. По яркости последние варианты данных белков сопоставимы с яркостью обычных флуоресцентных белков.
- 2) Отмывку и добавление хромофора осуществляли с помощью собранного аппарата с несколькими дозаторами, один из которых подавал буфер без хромофора, а с помощью

второго осуществлялась подача буфера с хромофором. Съемка проходила в специальных слайдах для одновременной микроскопии и промывки клеточной культуры раствором.

3) Область применения разработанной FRET пары заключается в исследовании процессов и белок-белковых взаимодействий в живых клетках и нахождении локализации исследуемых взаимодействий.

На заседании 7 июня 2023 г. диссертационный совет 24.1.037.01 принял решение за значительное расширение области применения системы мечения на основе вариантов липокалина и синтетических хромофоров, присудить Гаврикову А.С. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 8 докторов наук (по научной специальности 1.5.3 – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета



академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

7 июня 2023 г.