



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

---

## **СТЕНОГРАММА**

**заседания диссертационного совета Д 002.019.01  
при ИБХ РАН**

28 мая 2014 года

Защита диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук Билана Дмитрия Сергеевича на  
тему:

**«Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры  
окислительно-восстановительных процессов в живых  
системах»**

по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология

Москва – 2014

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 28 мая 2014 года.

Зам. председателя диссертационного совета  
Член-корр. РАН

В.М. Липкин

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

На заседании Совета из 30 членов присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации – 6:

1. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
3. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
4. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
5. Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
6. Член-корр. РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
7. Член-корр. РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
8. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
9. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
10. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
12. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
13. Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
14. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
15. Д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
16. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
17. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
18. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
19. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
20. Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
21. Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
22. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
23. Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

### **Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Ну, а теперь переходим собственно к повестке дня. Итак, защита Дмитрия Сергеевича Бирана кандидатской диссертации. Материалы личного дела Владимир Александрович.

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

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечается, что материалы личного дела и документы предварительной экспертизы соответствуют требованиям Положения ВАК).

### **Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Есть ли вопросы, какие-то сомнения, дополнения? Как и ожидалось, таковых нет. Спасибо. Дмитрий Сергеевич, слово для доклада, двадцать минут.

**Д.С. Билан:**

(Излагает основные положения диссертационной работы.)

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Спасибо за доклад. Вопросы к докладчику?

**Д.х.н., проф., Бовин Н.В.:**

У меня по первой части работы вопрос. Когда проводили мутации НуPer, это были, наверное, не случайные мутации, здесь какая-то логика была заложена, не могли бы вы пару слов сказать, какая логика была в проведении этой части работы?

**Д.С. Билан:**

Да, конечно. Произошла удивительная вещь, когда мы пытались усовершенствовать наш биосенсор, мы получили случайно НуPer-2, то есть обычно биосенсор улучшают таким образом, что проводят случайный мутагенез и затем проводят большой скрининг, пытаясь найти более лучшую по каким-то характеристикам версию. И вот в результате случайного мутагенеза был отобран НуPer-2, и для всех было большой неожиданностью, что мутация в ОхуR части чудесным образом улучшила биосенсор, потому что до этого пытались улучшить именно флуоресцентный белок. И это считалось логичным, что мы хотим улучшить спектральные характеристики и нужно улучшать соответственно флуоресцентный белок. Но вот мы обнаружили, что решающую роль играет мутация в ОхуR части, а дальше мы просто, используя уже литературные данные, смотрели, как другие мутации влияют на белок ОхуR дикого типа. И соответственно уже просто методом направленного мутагенеза мы вводили в этот интерфейс эти мутации и оценивали. Интересно, что эти мутации в сенсоре оказывают противоположный эффект, например, мутация аланин на валин в белке дикого типа наоборот дестабилизирует димер, но в нашем случае наоборот усиливает, то есть наш биосенсор НуPer-2 с этой мутацией является прочным димером. Предсказать это довольно сложно. Вообще, все биосенсоры делаются примерно так. Можно, конечно, применять какие-то программы, помогает рентгеноструктурный анализ, чтобы определить подвижные участки, например. НуPer, НуPer-2 и НуPer-3 были получены таким образом. Случайно получив НуPer-2, мы улучшили и сделали НуPer-3.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

У меня вопрос не специалиста. Ваш сенсор генетически кодируемый, правильно? Поэтому, чтобы *in vivo* его применять вы должны работать с трансгенными организмами. У меня вопрос. Ваш сенсор, ген его должен экспрессироваться хорошо. Уровень экспрессии его зависит от того, каким образом происходит внедрение этого гена в организм и от того, как вы мутируете структуру, то есть, зависит ли структура на уровне экспрессии белка, зависит ли методика внедрения гена в геном организма на уровне экспрессии? По этому поводу, что можно сказать?

**Д.С. Билан:**

Если сравнивать уровень экспрессии НуPer, НуPer-2 и НуPer-3, то, конечно, влияния нет, потому что разница этих биосенсоров в одной точечной мутации. Что касается экспрессии, то мы действительно использовали трансгенное животное, которое было получено совместно с нашими коллегами немецкими, Клеменс Грабер и его группа помогали. И соответственно, получена была такая версия, но можно, кроме того, колоть м-РНК, что в принципе тоже было сделано. Но было выяснено, что почему-то сигнал довольно слабый и нам показалось, что проще получить трансгенную линию, и она была получена совместно с нашими коллегами.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

То есть вы оптимизируете каким-то образом получение трансгенных...

**Д.С. Билан:**

Ну да.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Вопросы?

**К.х.н. Василевский А.А.:**

И вы, и ваши конкуренты взяли за основу T-Rex для получения сенсора НАД+/НАДН. Это вот что, настолько очевидно, что надо именно этот белок? Многие ведь белки связывают НАД, НАДФ.

**Д.С. Билан:**

В мире есть группы ученых, которые делают биосенсоры. И все находятся в поиске, в том числе и мы, хорошего такого природного биосенсора. И вот данный биосенсор T-Rex действительно является природным биосенсором, он является транскрипционным фактором, он из довольно экзотичного организма. Он действительно находка для многих исследователей. С нашими иностранными коллегами мы совпали в том, что выбрали T-Rex. Есть биосенсоры, которые также регистрируют соотношение НАД+/НАДН, и в качестве их основы был взят биосенсор B-Rex, он отличается незначительно. Вообще это находка. Такие сенсоры мы ищем, в том числе, например, предполагается в дальнейшем создать биосенсор НАДФ+/НАДФН соотношения. Он еще не создан, поэтому я думаю, что не только мы, все находятся в активном поиске белка, который бы позволил нам это сделать. А нуклеотид-связывающих белков действительно очень много, но не все они нам подходят, потому что, выбирая биосенсор, главное требование - чтобы он желательно не находил партнеров в эукариотической клетке в том числе. Многие нуклеотид-связывающие белки обладают какой-нибудь ферментной активностью, связывают какие-то элементы, поэтому поиск довольно узкий. Мой ответ таков.

**Д.физ.-мат.н., проф., Ефремов Р.Г.:**

Скажите, пожалуйста, а в клетке в какой среде находится, в каком окружении находится ваш сенсор? Это ведь неразбавленный раствор, там присутствуют наверняка другие молекулы белков, низкомолекулярные соединения. И просто достаточно удивительно, что одна мутация на интерфейсе димеризации аланин на валин так сильно влияет на спектральные характеристики. Не может ли случиться, что взаимодействия каких-то низкомолекулярных соединений, которые наверняка там могут быть в микроокружении, что они могут влиять на характеристики димеризации, то есть насколько устойчив результат?

**Д.С. Билан:**

Вопрос действительно очень интересный. К сожалению, о нем мы можем только рассуждать, потому что ответ неясен. Возможно, когда-то со временем, сделав рентгеноструктурный анализ всех биосенсоров NuPer, мы сможем ответить, почему же одна мутация сыграла такую решающую роль. Как он находится в клетке, тоже мы не можем дать однозначного ответа, учитывая, что все эти биосенсоры работают. Более того мы пытались их тестировать какие-то спектральные характеристики и за исключением того, что NuPer-2 медленный и димер, остальные спектральные характеристики схожи, квантовый выход и прочее. Поэтому однозначного ответа нет. Трудно сказать, что же именно происходит в условиях клетки. Тем не менее, это не

мешает использовать эти биосенсоры как хороший инструмент для регистрации пероксида водорода.

**Д.х.н. Дзантиев Б.Б.**

Спасибо, очень интересная и изящная наука, но когда вы произносите слово «биосенсор», понятно, что речь должна идти не только о научных, но и, если хотите, каких-то потребительских характеристик. Вот наверняка вы знаете всю литературу в этой области. Вот как по части определяемых концентраций пероксида ваш сенсор сопоставить можно с другими? Допустим, вы наверняка знаете о берлинской лазури, очень простой такой сенсор, позволяет на десять в минус девятой моля определять. Вот как в этом плане? И все, кто работает в области биосенсорики, прекрасно понимают, что Ахиллесова пята это стабильность биокомпонентов во времени. Как в этом плане смотреть не с точки зрения диссертации, а с точки зрения конечного потребителя? Как по части стабильности реагента?

**Д.С. Билан:**

Первый вопрос относительно того, как сопоставляется наш биосенсор собственно с физиологическими условиями, то есть как я понял, вопрос звучал в том, что может ли биосенсор регистрировать перекись, которая встречается в физиологических концентрациях. Сравнить его какими-то методами независимыми довольно сложно, потому что биосенсор является единственным в своем роде и никакие красители в параллель с нашим сенсором нельзя сопоставить, потому что многие красители обладают рядом недостатков, их невозможно использовать на живых клетках в режиме реального времени. Но я хочу сказать, что мы, конечно же, оценивали сродство нашего биосенсора к пероксиду водорода и убедились, что это сродство примерно соответствует ОхуR дикого типа. Кроме того, мы сравнивали константы скорости, и константы скорости наших биосенсоров совпадают с константой скоростью ОхуR дикого типа. Биосенсор как раз лежит в том физиологическом диапазоне. И не случайно во многих моделях, которые применяются с использованием нашего биосенсора, биосенсор прекрасно видит даже небольшие колебания концентрации перекиси. Что касается второго вопроса, стабилен ли биосенсор, я скажу, что да, он стабилен. В моей практике были работы экспериментальные, где нужно было в течение ночи или полусуток регистрировать какой-то медленный процесс, какие-то флуктуации. И главное, чтобы жили клетки, то есть клетки находятся в среде. В принципе он гораздо стабильнее, чем многие красители. Сейчас идет попытка улучшить яркость биосенсора, это, соответственно, позволит нам снижать какие-то настройки, понижать интенсивность лазера, то есть еще более щадящие условия. Поэтому в этом случае генетически кодируемые сенсоры, конечно, во многом выигрывают все известные синтетические аналоги.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

И все-таки здесь назывались цифры чувствительности, у берлинской лазури. Можно цифры чувствительности ваших сенсоров?

**Д.С. Билан:**

НуPer чувствует, его пороговое значение 25 наномоль. Хороший сигнал уже виден.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

То есть это получается десять минус в пятой... Десять минус в седьмой... Я не знаю, как сравнивать с тем, что вы давали.

**Д.х.н. Дзантиев Б.Б.**

Не рекордсмен, но хорошо.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Не рекордсмен, но хорошо. Понятно. Есть еще вопросы? Да, прошу.

**К.х.н. Сурин А.М.**

У меня два вопроса. Первый, так сказать, более легкий. Правильно ли я понял, что на картинке где было показано возбуждение триста сорок - это возбуждение автофлуоресценции НАДН идет?

**Д.С. Билан:**

Да

**К.х.н. Сурин А.М.**

То есть сопоставление автофлуоресценции с флуоресценцией экспрессируемого сенсора, да? И таким образом можно создать некое подобие рациометрического метода?

**Д.С. Билан:**

Рациометрический здесь сложно сопоставить, потому что, во-первых, это эксперименты *in vitro*. Это в пробирках, где у меня биосенсор и избыток НАД+. Более того, это скорее наглядная картинка, которая показывает, что НАДН в системе действительно происходит увеличение, потому что сенсор возбуждается длиной волны четыреста девяносто, и мы попадаем не в максимум пика НАДН, а попадаем в плечо. Но просто из-за того, что НАД+ в системе избыток, мы видим, что интенсивность растет, поэтому эта картинка не в целях получить какие-то точные данные, а просто демонстрация того, что у нас в одной системе одновременно происходит увеличение НАДН, меняется соотношение НАД+/НАДН. И при этом меняется сигнал нашего биосенсора, то есть это скорее показательный эксперимент.

**К.х.н. Сурин А.М.**

То есть двойное подтверждение.

**Д.С. Билан:**

Да

**К.х.н. Сурин А.М.**

Спасибо. И второй вопрос, если можно. Вот замечательная, красивая, интересная, очень важная картинка распределения пероксида водорода при раневом повреждении рыбки, хвостового плавника. И там FLIM. Вот как бы продолжение вопроса Романа Гербертовича, вы показали, что замена аланина на валин, вообще-то из общих соображений совсем мизерная замена, вообще в другой, очень удаленной, ну, по крайней мере, по последовательности части этого химерного белка сильно влияет на спектральные свойства, да?

**Д.С. Билан:**

Да

**К.х.н. Сурин А.М.**

То есть эта система, НуPer-3, весьма высоко чувствительна к каким-то изменениям микроокружения. Вопрос. Почему вы считаете, что вот это вот распределение интенсивности отражает изменение пероксида водородра, а не чувствительность

вашего химерного белка к изменению микроокружения? Ну, например, в результате раневого повреждения могли поменяться величины рН, на очень маленьких расстояниях от места ранения. И это никакого отношения к пероксиду водорода не имеет. И маленькое примечание к этому же. Вы вначале сказали, что раньше считалось, что FLIM годится только для переноса энергии. Это неправильная предпосылка, к сожалению. Потому что FLIM или время жизни отражает изменение микроокружения, а перенос энергии всего лишь частный случай этого события. Поэтому FLIM очень широко применяемый метод, поэтому подвергнут многим недостаткам. Почему вы считаете, что это пероксид?

**Д.С. Билан:**

Сразу скажу, что картинки, которые мы получили для FLIM, они были получены не только для НуPer-3. Просто усовершенствовали НуPer-3, поэтому в свою работу я включил результаты по НуPer-3. Если, например, будем сравнивать НуPer, то там тоже будет отображение того, что время жизни окисленного и восстановленного биосенсора отличается. То есть это общая характеристика всех биосенсоров этого типа. Почему мы считаем, что это не рН? Потому что до этого проводились работы, и было показано с помощью биосенсора SyrPer, который я упоминал – сенсор на рН изменения, было показано, что никаких рН колебаний в данной модели нет. Поэтому были проведены контроли, по всей видимости, это действительно свойство нашего биосенсора. Более того, работа продолжается в этой области, буквально этим летом намечен план. С помощью использования техники, мы попытаемся оперировать уже отдельными молекулами, и, возможно, дадим более полный ответ, что же на самом деле происходит с окружением. Когда я говорил о том, что FLIM применяется только для биосенсоров, основанных на FRET взаимодействиях, я, конечно же, не имел в виду, что FLIM только для FRET биосенсоров. Просто рассматривая различные биосенсоры, их многообразие, более применимы как раз FRET-биосенсоры в рамках моей области. И то, что сенсор на основе одного флуорофора, на основе однохромового белка, может изменять время жизни флуоресценции и довольно сильно, что можно даже регистрировать это *in vivo*, это было очень интересное событие. Надеюсь, что оно найдет своей дальнейшее направление и применение.

**К.х.н. Сурин А.М.**

Спасибо.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Ну что иссякли вопросы? Их было много очень разных. Мы получили исчерпывающие ответы. Дмитрий Сергеевич спасибо, отдохните немножко. Переходим к заслушиванию отзывов. Отзыв ведущей организации.

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

Ведущая организация – Институт биохимии имени Баха. Отзыв полностью положительный.

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный).

В отзыве содержатся следующие замечания:

- Автор к сожалению 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.

- Помимо этого, автору следовало бы провести оценку ложно-положительного результата срабатывания сенсора в результате колебания количества ФАД в живой системе, сопряженного с редокс-статусом клетки.

- Кроме того, автор изучает отклик сенсора только при добавлении пероксида водорода извне, тогда как более логичным выглядело бы построение физиологической модели и стимуляции клетки и индукции естественного окислительного стресса и сравнение отклика сенсора с результатами измерения уровня  $H_2O_2$  независимыми методами.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Дмитрий Сергеевич, там была пара замечаний. Хотелось бы услышать ваш ответ на них.

**Д.С. Билан:**

Я благодарю Александра Павловича Савицкого, представителя ведущей организации, за положительный отзыв.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Все благодарности в конце.

**Д.С. Билан:**

Постараюсь ответить на поставленные вопросы. Первый вопрос по поводу регистрации времени жизни флуоресценции, этот вопрос уже поднимался. Кратко я повторяю, что мы использовали технику фазово-модуляционную при работе с нашим биосенсором. Исходили просто из наличия того оборудования, которое у нас было. И мы соответственно принимаем, что разница между фазой и модуляцией времени жизни флуоресценции говорит нам о мультиэкспоненциальном затухании возбужденного состояния. Поэтому в дальнейшем, как я уже говорил, планируем проводить работы с использованием другого оборудования, что позволит нам узнать, что происходит на уровне отдельных молекул. Второй вопрос был посвящен оценки ложно-положительного сигнала срабатывания биосенсора в результате колебаний количества ФАД. Мы считаем, что окисленные флавины не влияют на сигнал нашего биосенсора, потому что флуоресценция нашего биосенсора и флуоресценция окисленных флавинов несопоставимы. Если, например, откроем фотографию клеток (показывает слайд), видим только затрансфецированные клетки, пустые места не означают, что клеток нет. Они есть, но просто не затрансфецированы. Сигналы микроскопии настолько высоки, что мы детектируем только наш сигнал, сигнал нашего биосенсора. Поэтому влияние окисленных флавинов, если оно и встречается в каких-то моделях, мы считаем, что оно минимально или отсутствует полностью. Также в отзыве указывалось, что мы используем внешний пероксид водорода, а не физиологические модели. В рамках данной работы было усовершенствовать биосенсор НуPer. Для того чтобы усовершенствовать биосенсор необходимо было его откалибровать. Соответственно трудно представить себе, что мы можем найти какую-то физиологическую модель, которая бы из эксперимента в эксперимент показывала нам одинаковое значение колебаний концентрации перекиси. Поэтому первым нашим шагом было откалибровать биосенсор, добавляя известные концентрации пероксида к клеткам. Кроме того, я немного не соглашусь, потому что в работе все-таки присутствует физиологическая модель. Мы работали *in vivo* на модели раны хвостового плавника, где сенсор себя очень хорошо чувствует и показывает нам градиент перекиси. Кроме того, использование НуPer – это отдельная глава, можно посвятить целую главу в диссертации, потому что НуPer уже является зарекомендованным сенсором, его используют многие группы. И сейчас в мире предостаточно физиологических моделей,



где он использован. Буквально каждый год выходят новые, можно сказать, сенсации. Например, наша коллега Урсула Джакоб детектировала уровень перекиси в нематодах на разных этапах развития, проанализировали от начала развития до самого старения как меняется пероксид. Известны и другие различные модели: добавление различных факторов роста. Говорить на эту тему можно много. Я уверяю, что биосенсор очень широко применяется в физиологических моделях, и для этого он создан. Следующий вопрос – сравнить биосенсор независимыми методами. Я тоже частично ответил уже на этот вопрос. К сожалению, это невозможно, просто потому что независимых методов на данный момент нет. И все имеющиеся красители не позволяют дать точную картинку, они могут сделать некую корреляцию, то есть посмотреть, что происходит, если мы детектируем красителями и биосенсором. А так, биосенсор NuPer это единственный биосенсор, который позволяет регистрировать этот важный параметр в живых клетках в режиме реального времени.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Все у вас, да?

**Д.С. Билан:**

У меня все.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Спасибо.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

В процедуре защиты есть такой момент: научный руководитель имеет право охарактеризовать своего подопечного. Всеволод Вадимович, желаете? Желаете. Слушаем внимательно.

**Д.б.н., Белоусов В.В.:**

Я постараюсь быть кратким, чтобы не раздувать размер стенограммы. Наш старший коллега Сергей Анатольевич Лукьянов в отношении молодежи любит употреблять термин «выращивать». И при всей ироничности этого термина, я могу сказать, что Дмитрия Сергеевича мы вырастили, и он вырос и принес замечательные научные плоды. С ним всегда и всем без исключения в нашей лаборатории и в лабораториях наших коллег было всегда приятно работать и не только в человеческом, но и профессиональном плане. Он пришел к нам на курсовой работе и, фактически начиная уже с диплома, руководство Дмитрием Сергеевичем с моей стороны заключалось в основном, сводилось к стратегическому планированию. Это человек, который получает нескрываемое удовольствие от самостоятельной работы и его несколько раздражает, если я прихожу к нему вне еженедельных семинаров, начинаю говорить: «Дима, ну что там, как там получилось?» Он говорит: «на семинаре, на семинаре расскажу». И это ценное качество, которое в совокупности с его способностями прекрасными к руководству другими людьми, студентами, аспирантами, делает его несомненно сильным научным сотрудником. И я вижу, что он имеет огромный потенциал и через несколько лет он будет вполне готов к тому, чтобы стать руководителем своей отдельной группы. И я надеюсь, что, я во всяком случае со своей стороны приложу все усилия, чтобы это произошло в нашем Институте. Но и надеюсь, что Институт тоже приложит соответствующие усилия к этому. Спасибо.

**Председатель, академик РАН Иванов В.Т.:**

Спасибо вам. Дошла очередь до официальных оппонентов. Борис Викторович Черняк, заведующий лабораторией Института Белозерского МГУ.

**Д.б.н., Черняк Б.В.:**

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

В отзыве содержатся следующие замечания:

- Первый и может быть существенный вопрос, это действительно ли он (биосенсор RexYFP) меряет соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН. То, что он меряет НАДН и достаточно чувствительно, было несомненно показано. То, что он может это делать на фоне НАД<sup>+</sup>, избытка НАД<sup>+</sup>, тоже было показано и особых сомнений не вызывает. Но если утверждается, что он меряет именно отношение НАД<sup>+</sup> к НАДН, то этих измерений недостаточно. То, что было сделано в сопряженной системе – тоже не отвечает на этот вопрос, потому что там одновременно меняется и НАД<sup>+</sup> и НАДН. И опять же таки выяснить, что меряется собственно НАДН или соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН не представляется возможным. Для того чтобы ответить на этот вопрос надо ставить отдельные опыты. Нужно при разных концентрациях НАД<sup>+</sup> мерить концентрационную зависимость от уровня НАДН, и определять, как она зависит или не зависит от уровня НАД<sup>+</sup>. Пока такое впечатление создается, что на самом деле меряется не соотношение, а просто уровень НАДН. Что тоже замечательно, но просто надо иметь это в виду.

- Еще целый ряд вопросов возникает при переходе к измерениям *in vivo* с помощью этого биосенсора (RexYFP). Если позволите, я покажу последнюю картинку (показывает на слайде). Я хотел бы обратить ваше внимание на вот какие обстоятельства. Хорошо известно, и это было показано неоднократно самыми разными способами, что, по крайней мере в митохондриях, после блокирования дыхания с помощью ротенона, НАДН возрастает очень быстро, ответ очень быстрый. То, что наблюдается колоссальное десятиминутное, двадцатиминутное, во всяком случае, многominутная задержка в этом измерении, это требует отдельного обсуждения. Если вы помните было показано, что на лактат, например, этот сенсор отвечает достаточно быстро, что говорит о том, что в принципе у него есть возможность ответить быстро на измерение НАДН. Почему он так медленно отвечает в этом случае, я не смог сам придумать объяснение. Может быть, уважаемый диссертант что-то нам объяснит.

- Второй вопрос, который возникает в связи с этими измерениями это, что происходит при разобщении? Разобщение это способ в данном случае простимулировать дыхание. Когда мы даем разобщитель – разобщается фосфорилирование, синтез АТФ и дыхание. И дыхание сильно возрастает, скорость дыхания сильно возрастает. И действительно, когда дыхание возрастает – НАДН падает, потому что окисляется дыхательной цепью, и это происходит, как мы видим, достаточно быстро. По всем существующим на сегодняшний день данным, это должно коррелировать и с уровнем НАДН в цитоплазме, потому что митохондрий довольно много в клетке. В данном случае я не помню, по-моему, это клетки HeLa, где митохондрий достаточно много. И нет никакого сомнения в том, что они должны окислять НАДН, который находится в цитоплазме с помощью шунтов, с помощью разных механизмов, но это достаточно очевидная штука. Почему это не наблюдается, я не очень понимаю. С этой же точки зрения совершенно не понятно, почему даже в митохондриях, где видно и очевидно снижение НАДН в присутствии разобщителя не происходит его восстановления под действием ротенона. Это уже абсолютно необходимая вещь, это не имеет никакого отношения к уравниванию НАД<sup>+</sup>/НАДН между митохондриями и цитоплазмой. Это просто свойство митохондрий. Если НАДН падает, то падает в результате того, что активируется дыхание. Ротенон дыхание ингибирует, он обязан поднять НАДН примерно на тот же уровень, который имел место до добавки разобщителя. Почему этого не происходит, это требует некоторых объяснений. Пока этих объяснений не будет представлено и не будет четко показано, что тут есть какая-то биологическая природа всего этого дела, а не просто какие-то особые свойства этого сенсора,

например, его способность с чем-нибудь связываться в цитоплазме, в митохондриях, что радикально меняет вообще его свойства по сравнению с тем, что было сделано *in vitro*, использование этого сенсора будет чрезвычайно затруднено.

(Председатель совета, академик РАН Иванов В.Т. по уважительной причине вынужден покинуть заседание. Далее заседание диссертационного совета ведет заместитель председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.)

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**

Спасибо, Борис Викторович. Пожалуйста, ответьте на замечания.

**Д.С. Билан:**

Спасибо большое за критические замечания, я попытаюсь ответить на них. Первый вопрос касательно того, почему мы позиционируем наш биосенсор именно как сенсор, который позволяет регистрировать соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН, потому что действительно сигнал биосенсора изменяется только при добавлении НАДН и не изменяется при добавлении НАД<sup>+</sup>. Этот вопрос очень правильный, нам очень часто его задавали. Но все же мы позиционируем наш сенсор, именно как сенсор на соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН. Потому что несмотря на то, что окисленная форма данного кофактора не изменяет сигнал биосенсора, тем не менее, окисленная форма кофактора НАД<sup>+</sup> все же связывается биосенсором. Поэтому в клетке и исходный транскрипционный фактор T-Rex и наш биосенсор всегда находятся в НАД<sup>+</sup>-связывающем и НАДН-связывающем состояниях, то есть между ними происходит конкуренция. Более того, в клетке окисленной формы кофактора существенно больше по сравнению с НАДН, поэтому важно было понять, как наш биосенсор чувствует себя в окружении обоих кофакторов. И на ранних этапах исследования, когда мы отбирали рабочую версию биосенсора, мы как раз пытались потитровать наш биосенсор в присутствии НАДН и присутствии разного количества НАД<sup>+</sup>. И надо сказать, что эти кривые титрования выглядели поразному, то есть чем больше НАД<sup>+</sup> в пробе, тем больше нужно было добавлять восстановленного кофактора, чтобы добиться, например, такого же сигнала, если бы мы добавляли меньшую концентрацию. Это говорит нам о том, что сигнал биосенсора зависит не только от того, сколько НАДН, но и зависит от того, сколько НАД<sup>+</sup> в системе. А сопряженную систему мы использовали, потому что нам казалось это проще. С помощью такого подхода мы могли исключить, например, ошибку внесения концентрации. Здесь у нас одна проба, в этой пробе находится заданная концентрация нуклеотида, который без всяких добавок постепенно перетекает в восстановленную форму и можно регистрировать соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН. Более того, можно сказать, что основой нашего биосенсора является бактериальный T-Rex, он тоже позиционируется как природный сенсор на соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН. Поэтому здесь дело не только в том, как он чувствует НАДН, но еще и в том, сколько окисленной формы кофактора находится в окружении.

Второй вопрос тоже очень интересен и очень актуален по поводу того, что мы видим при ингибировании дыхательной цепи митохондрий на уровне комплекса I с помощью ротенона очень медленный отклик. И я, конечно же, соглашусь с уважаемым оппонентом в том, что литературные данные говорят нам о том, что действительно ингибирование дыхательной цепи митохондрий на уровне комплекса I очень быстро приводит к накоплению НАДН в клетке. Однако здесь разница в подходах. До создания биосенсоров существовали биохимические методы. А биохимические методы не могут нам дать точную картину, поскольку мы регистрируем общий пул кофактора, то есть не учитываем, например, связанного НАДН различными нуклеотид-связывающими белками. Известны соответственно методы UV-микроскопии и мультифотонной микроскопии, но и они не дают нам такой подробной картины, потому что, как

известно, используя этот тип микроскопии, мы регистрируем не только НАДН, но регистрируем и НАДФН, регистрируем окисленные флавины. Мы не получаем никакой информации об окисленной форме кофактора, о НАД<sup>+</sup>. Поэтому разница в результатах наших с теоретическими данными, литературными, она может быть связана как раз с тем, что у нас совершенно иной подход к этой проблеме. Более того, очень таким хорошим аргументом в нашу защиту выступает то, что мы использовали биосенсор Peredox, у которого очень высокое сродство, менее 5 нм. Это на порядки больше, чем у нашего биосенсора. Если вы посмотрите на нижнюю картинку (показывает на слайде), то мы видим, что Peredox, биосенсор сверхчувствительный, он тоже при добавлении ингибитора ротенон реагирует не мгновенно, то есть это примерно минутная шкала, десять – пятнадцать минут. Это говорит о том, что действительно возможно процессы отражаются каким-то другим механизмом. И кроме того можно предположить, что мы регистрируем именно свободный пул нуклеотидов, то есть наверняка при ингибировании дыхательной цепи митохондрий происходит увеличение НАДН, но биосенсор находится в конкуренции со всем окружением белков. В клетке есть сотни, может и больше нуклеотид-связывающих белков. Поэтому НАДН не просто накапливается в клетке, что было показано другими экспериментами, когда получали гомогенаты, мерили общий пул, возможно, сенсор просто не видит увеличивающийся НАДН просто по причине того, что связывается. Но, тем не менее, мы все равно видим прирост НАДН как в цитоплазме, так и в матриксе митохондрий. Вот у меня еще есть в запасе картинка, которая показывает одну интересную особенность. А именно то, что мы впервые на индивидуальных клетках попытались измерить сигнал биосенсора в условиях ингибирования дыхательной цепи митохондрий. Мы нашли очень интересную вещь, оказалось, что сигнал биосенсора как нашего, так и наших коллег очень гетерогенен. Вот здесь перед вами представлены кривые (показывает), которые отражают сигнал в индивидуальных клетках. Мы видим, что, например, клетка один довольно быстро достигает своего максимального значения, которое в принципе остается на одном уровне. Клетка, которая красным помечена и зеленым наоборот показывает, что динамика очень медленная. И это сделано на Peredox, еще раз повторяю на очень чувствительном сенсоре. Есть клетки, в которых при добавлении ротенона наоборот происходит небольшое падение НАДН, и только потом происходит увеличение. Поэтому возможно, что мы действительно показали в этой области что-то новое с применением наших биосенсоров. И это требует, конечно, дальнейшего рассмотрения. Мы будем рады, если другие коллективы когда-то займутся этой идеей. То же самое я могу сказать и об экспериментах с разобщителем, что я не могу однозначно сказать, что именно происходит и чем именно объясняется. Это действительно требует дальнейших исследований, потому что наша задача была создать биосенсор, протестировать его в неких моделях, и в ходе тестирования мы нашли многие интересные особенности, которые, безусловно, требуют дальнейшего изучения. И в частности СССР тоже один из случаев, что мы видим действительно очень быстрое и интенсивное падение НАДН в матриксе митохондрий, но не видим этого в цитоплазме. Наоборот мы даже видим кратковременное увеличение НАДН, что там именно происходит сказать на данный момент трудно. Возможно, какие-то компенсаторные механизмы включаются. Если к разобщающей цепи добавить ротенон, и она более не работает дыхательная цепь, в литературе описано, что происходит увеличение НАДН. В нашем случае мы видели, что НАДН все же растет, но это очень медленная динамика, это десятки минут происходит. Максимум что я видел это достижение половины от того значения сигнала, который известен. Это требует, я согласен, безусловно, дальнейшего изучения. Мне кажется, я ответил.

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**  
Спасибо. Борис Викторович, удовлетворены ответом?

**Д.б.н., Черняк Б.В.:**

Я удовлетворен вполне, я только хотел отметить, что эта гипотеза о том, что все дело в том, что существует пул связанного НАДН и свободного НАДН, и вы меряете только свободные, а все остальные меряют общий – она очень интересна, но она требует доказательств, потому что альтернативное предположение состоит в том, что просто ваш сенсор с чем-то связывается, и это затрудняет его деятельность. А ответами вполне удовлетворен.

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**

Спасибо. Разрешите предоставить слово второму официальному оппоненту. Кандидат биологических наук Воротников Александр Вячеславович, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии Института экспериментальной кардиологии. Пожалуйста.

**К.б.н., Воротников А.В.:**

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

В отзыве содержатся следующие замечания:

- На первом рисунке в диссертации по НАДН-сенсору, естественно, Дмитрий Сергеевич приводит формулу НАДН, той самой молекулы, которая находится под инвестиацией. Открываю картинку и вижу, что формула то неправильная. Понятно с интернета, наверное, скачено. Думаю, «залезу» в интернет, посмотрю. «Залезаю» в интернет, оказывается две трети неправильных формул, только одна правильная. Почему? Вы можете догадаться на самом деле ошибка где. Либо в основании ошибка указывается, аденин, либо в рибозе. Ну там и была ошибка, не рибоза, а тетроза, забыли  $\text{CH}_2$ . Кроме того кислород забыли, дезокси оказалась. Но это ни коем образом на суть работы не влияет. Но это показывает легкость, как человек легко относится к вещам, к тем, к которым можно. Вот это я замечание сделал, к которым можно. Ну, хорошо, можно было бы забыть. Но вот дальше уже более серьезный момент такой относительно легкости, не было бы отдельной главы, касаемой периодов полуокисления и полувосстановления. Я кстати все-таки придерживаюсь этой терминологии, мне кажется, что период полуокисления и период полувосстановления, а не как в диссертации, как Дмитрий Сергеевич пользуется, что полупериод восстановления. Если так задуматься, это две разных величины. И вообще-то интерес больший и важность имеет период полуокисления. Ну ладно, это опять же кулуарные вопросы. Но вот эта глава, посвященная определению сенсорному, и в ней задача, конкретно в этой главе ставится: мы должны определить сродство сенсора к субстрату, перекиси. Это все идет речь про НуPer-2, НуPer-3, НуPer-1. Мы должны определить сродство, и мы должны определить скорости восстановления и окисления. Ну, думаю, сейчас. Мы с Дмитрием Сергеевичем с одной кафедры биохимии, думаю, сейчас я биохимию увижу, стандартную биохимию, Лайнуивера-Берка, все эти титрации, как предыдущий оппонент говорил титровка, конечно, нужна. Нет? Вообще-то там этого не было, иллюстративного материала, то есть обидно. Легкий подход, зачем давать лишние графики, если можно сразу цифры дать? Цифры там были в конце, но честно говоря, не очень понятно как они были получены, вернее технически это понятно, но не видно, как это было получено. Я это отношу за счет легкости написания, не за счет ошибки, ну это, безусловно. Почему? Потому что вообще-то нас интересует жизнь, правильно? То есть, вообще-то нас интересует научная сторона, а не формальная сторона вопроса. Научная сторона этой диссертации очень важна, эта работа очень важна и она, конечно, перекрывает все. Может, даже немного в пользу Дмитрия Сергеевича скажу, подискутирую с предыдущим оппонентом. Было сказано, что до тех пор, пока какие-то

вопросы остались неотвеченными применение сенсоров будет ограничено. Я бы поспорил. Я бы сказал, что применение сенсора не будет ограничено. Он будет применяться и точно совершенно. Другое дело – интерпретация результатов будет немножко ограничена и затруднена. И вот это две разные вещи: интерпретация и применение. Безусловно, работа имеет колоссальное научно-техническое значение.

Я точно могу сказать, что если подойти с точки зрения клеточного вопроса, но я понимаю, что диссертации профиль молекулярно биологический, а клеточный нужно смотреть. Клеточная сторона – здесь очень много любопытных вопросов возникает, нужных для получения правильных данных. Например, эти самые полупериоды окисления и восстановления. Элементарную ситуацию на клетках я опишу: светишь на НуPer-1, эта штука позволяет смотреть в реальном времени, на него светишь каждые пять секунд, допустим, и думаешь две вещи: первая вещь – вот я посветил и через пять секунд посветил, у меня перекись от него отсоединилась или нет. Ловит ли он конкретную динамику пероксида или он продолжает светиться сам? Пероксид уже ушел, сигнал уже ушел, молекула, которую он ловит уже ушла в клетке, а НуPer светится. Период полувосстановления у него очень большой, длинный, он заловил молекулу и светится. Мало того, что он просто светится, он еще и в клетке двигается. Вот этот самый НуPer, если он не к чему не привязан, двигается со скоростями реально очень близкими к пределу диффузии. И если его посветили вот здесь, он через две секунды там оказался в клетке. А там перекиси нет, а он светится. Поэтому вопросы, связанные с периодом полуокисления, периодом полувосстановления и интенсивности – они очень важны для реальных измерений. И этот вопрос не просто галочка в диссертации, это очень важный вопрос, который нужно было адресовать. И именно поэтому НуPer-3 была очень правильная и нужная версия. И интенсивность, казалось бы, динамический диапазон, все понимают это как – получше светит, здорово, ловит более мелкие концентрации. На самом деле, как показывает Rex – мелкие концентрации ловить не так иногда важно. Rex не настолько чувствительный как Peredox, но это позволяет ему быть использованным в митохондриях. Тот слишком чувствителен и не может быть, а этот может. Так что иногда хуже, это значит лучше. Динамический диапазон важен еще для чего? Не только для того, чтобы маленькую концентрацию перекиси поймать, а потому что зашкаливает и реально, когда в живых клетках работаешь, это очень важный параметр, именно динамический диапазон.

Последнюю иллюстрацию хотел привести, просто вопрос обсуждался очень долго. Но заметим с химической стороны, опять же с клеточной. Вот последний слайд, только что обсуждался (показывает слайд). Почему такое? На самом деле, я не скажу, что объясню это, я просто могу дать альтернативное объяснение какое-то, может это не так. Но таких объяснений очень много бывает, и это отдельная работа – выяснять какое из них работает. Эти клетки, которые были использованы в работе HeK и HeLa, вообще-то это трансформированные клетки, скажем так, раковые или полураковые. Для таких клеток, которые живут в культуре вот так вот неконтролируемо для них что характерно? Они очень плохо используют окислительное фосфорилирование и живут в основном на гликолизе. Поэтому вы льете ингибитор на окислительное фосфорилирование и эффекта особого не видите, я так думаю, потому что они на гликолизе. А если мы налили туда разобщитель – вот это другое дело. Разобщитель разобщает, он действует немедленно, и мы видим эффект. Ротенон не действует, разобщитель действует и сразу. Это такой момент тоже важный – выбор клеточной модели, потому что гликолиз для клеток гораздо более важная штука. Конечно, НАД<sup>+</sup>/НАДН участвует, но любой нокаут фермента гликолиза приводит к немедленной гибели организма и клетки. А вот нокаут оксидативных ферментов не всегда. Есть такие клетки, так называемые Ro0 клетки – это клетки, в которых «убита» митохондриальная ДНК. Они не способны вообще функционировать по дыхательной цепи, у них не работает дыхательная цепь. Потому что главные ферменты дыхательной цепи идут из митохондриальной ДНК. Клетки

живут в отличие от тех, где гликолиз порушен. Они плохо конечно живут, они выживают, но они живут. В них тоже было бы любопытно проверить действие этого сенсора. Все, я, наверное, слишком затянул. Но я надеюсь, что я побудил исполнителей и работников этой лаборатории к последующим научным изысканиям на эту тему. Спасибо.

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**

Спасибо. Пожалуйста, ответьте на замечания.

**Д.С. Билан:**

Спасибо большое. Начну по порядку. По поводу опечаток сказать мне, конечно, нечего. Надеюсь, что это единственная опечатка, которая встречается в моей работе, где ошибка в формуле. В защиту могу сказать, что картинка была скачена не из интернета, из классических учебников. Картинка подверглась русификации для диссертации, возможно где-то атом водорода «затерялся», поэтому я кроме как принести извинения не могу. Что касается термина периода полуокисления, как я назвал полупериод окисления, я согласен, что возможно мы допустили терминологическую ошибку, хотя можно померить и полупериод окисления, и период полуокисления. Более того, на фоне этих дискуссий вчера я для биосенсоров НуPer попытался померить и период полуокисления и полупериод окисления. Оказалось, что в нашем случае, возможно к счастью, эти величины все же не очень отличаются по своему значению. Но, тем не менее, я согласен, что терминологически два понятия эти можно разделить. Далее вопрос к тому, что мы сравнивали почему же биосенсор НуPer-2 по сравнению с другими вариантами НуPer и НуPer-3 более медленный. Здесь два предположения: либо константа сродства, то есть просто сродство биосенсоров разное, либо скорости реакции взаимодействия с пероксидом могут как-то отличаться. В своей работе, возможно, мне стоило более подробно обсудить. В защиту могу сказать, что опирался я на классические университетские учебники по определению этих констант. Поэтому в диссертации я привел только финальные значения. Кратко я могу сказать, как это происходило. Константы скорости реакции мы находили стандартным образом, но необходимо было адаптировать к нашим условиям. Потому что принято работать с выделенным белком, то есть в системе *in vitro*. В нашем случае белок НуPer очень сложно выделить, его практически невозможно выделить в полностью восстановленном состоянии. Более того, его очень сложно поддерживать, поэтому измерять кинетику на выделенном препарате, который нестабилен – это не очень правильно, потому что от эксперимента к эксперименту, напомним, нам нужно было сравнить три биосенсора, сравнить было очень сложно. Сразу хочу сказать, что на данном этапе мы не стремились рассчитать некую конкретную величину очень точно, нам важно было сравнить три наших биосенсора относительно друг друга. И вот мы выбрали метод быстрой съемки, используя мю-слайды, так называемые. Я привел слайд (показывает) на котором изображен такой мю-слайд, выглядит как обычный слайд, у которого дорожки. Этой дорожки объем очень небольшой, буквально 100 микролитров. В этом слайде культивируются клетки, там же проходит трансфекция. Их преимущество заключается в том, что очень быстро можно поменять среду, буквально одним нажатием пипетки можно заменить, с заданной концентрации пероксида водорода. Мы шли с неким шагом, рабочая концентрация от пяти до четырехсот микромоль, протитровали все биосенсоры. Соответственно, меняли среду от минимальных концентраций до высоких. Получали кривые ответа. Далее мы сделали упрощение, то есть мы считаем, что реакция НуPer с пероксидом является реакцией псевдопервого порядка, хотя можно рассматривать как реакцию второго порядка, потому что два участника, биосенсор и пероксид водорода. А псевдопервого порядка, потому что мы сделали упрощение, потому что считаем, что концентрация биосенсора в момент

реакции с пероксидом остается постоянной. И вот на кривых ответа мы нашли линейный участок, считая, что скорость реакции на этом участке постоянна и дальше уже расчетные цифры мы получаем (показывает на слайде), то есть находили отношение изменения сигнала, дельта сигнала, к изменению времени, это собственно и есть скорость. Можно получить кривые зависимости этой величины от известных концентраций. Далее уже здесь мы выбирали линейные участки, дальше, о чем говорил уважаемый оппонент, можно применять методы линеаризации, и константы скорости реакции мы, таким образом, нашли. При этом мы учитывали такую вещь, что мы работали не с выделенным белком, мы работали с клетками. Поэтому нужно было учесть некий коэффициент, который бы нам позволил сказать, а сколько пероксида вообще проникает в клетку, потому что нужно учесть еще диффузионные процессы через мембрану. Мы знаем, что выделенный белок реагирует от двадцати пяти наномолей пероксида водорода, мы знаем минимальную концентрацию пероксида водорода, которую нужно добавить к клеткам, экспрессирующим биосенсор, чтобы увидеть ответ. Это примерно от пяти до двадцати пяти микромолей, то есть теоретически или экспериментально, это как посмотреть, мы находим некий градиент, поэтому вводим коэффициент. И все величины, которые представлены в моей работе, они с учетом этого коэффициента. Более того, я скажу, что константа скорости реакции биосенсоров в одном порядке при таком нашем подходе с OxyR дикого типа, то есть мы попали в ту же самую величину. Что касается сродства, то мы тоже проверяли. Сродством мы считаем минимальную добавку пероксида водорода, на которую мы видим отклик нашего биосенсора в клетках. И хочу сказать, что сродство, то есть минимальная добавка для всех биосенсоров, она одинакова. То есть разница ответа НуPer-2 заключается лишь в том, что у него другая константа скорости реакции, поэтому он более медленный. Надеюсь, что я ответил достаточно подробно на этот вопрос. Далее к вопросу о том, как работать с живыми клетками. Безусловно, при постановке любого эксперимента нужно учитывать различные факторы, в том числе специфично или не специфично работает биосенсор, его распределение и прочее. И не случайно уже приведено множество работ, где биосенсор локализовали, например, на мембрану, его сшивали с различными другими белками. Необходимо ставить контроли, в этом я со своим оппонентом полностью согласен. Перед каждым экспериментом нужно думать о возможности применения биосенсора.

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**

Спасибо. Александр Вячеславович, согласны?

**К.б.н., Воротников А.В.:**

Да, спасибо. Я даже думаю, что здесь Дмитрий Сергеевич больше сказал, чем нужно. Единственное я для формальности хочу сказать, в отзыве еще есть некие вопросы тоже дискуссионного характера. Я думаю, что их можно не обсуждать, связанные с димеризацией сенсора, это опять же вопрос касательно может быть так, а может быть не так.

**Д.С. Билан:**

Я могу ответить.

**К.б.н., Воротников А.В.:**

Это, как решат. Они не имеют принципиального характера.

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**

Спасибо. Теперь диссертация открыта для обсуждения. Кто хотел бы выступить, пожалуйста.



**Д.х.н., проф., член-корр. РАН Габибов А.Г.**

Было очень приятно присутствовать при этой защите, потому что это действительно было научное обсуждение. И мы заслушали, я бы квалифицировал, не навязывая своего мнения, доклад уважаемого диссертанта, это было научное эссе. И доклад первого и второго оппонента, это были тоже научные эссе. Это очень приятно. Я должен сказать, что моя увлеченность флуоресценцией основана на том, что я был дипломником профессора Савицкого, который писал отзыв на эту работу. Работа действительно мне очень понравилась, и я отношусь к ней действительно так, поскольку она защищается по специальности молекулярная биология, многие вопрошавшие здесь спрашивали, конечно, фундаментальные вопросы. Почему замена одной аминокислоты привела к таким интересным последствиям. Ответы на них, конечно, я хотел тоже задать, может, надо было заниматься второй сферой, и это привело бы к еще более интересным результатам. То есть подойти к биосенсору данному, как принято сейчас подходить к биокатализаторам. Но всего сделать в работе было невозможно. Вторая часть вопросов была связана вообще-то с практической областью. И здесь вопросы были достаточно жесткие, потому что понятно, что если создан вообще-то технический образец, технологический такой, то к нему конечно же предъявляются вопросы в каких условиях его применять, где ограничения. Но это, конечно же, уже в известной степени на совести того исследователя, который будет применять вот эту замечательную, такую научно-практическую разработку. Мне кажется, что очень приятно, что эта диссертация защищается в нашем Институте. Единственное, вот ваше длительное обсуждение в отношении кинетик. Я не знаю, зачем искать линеаризацию при современных методах компьютерной обработки кинетических данных, мне кажется это даже не нужно. Вы могли симулировать механизм, и к нему подстраивать. Но какие вопросы, такие и ответы. Мне кажется, что эта работа имеет действительно очень интересные перспективы. И возможно она будет связана с данными по рентгеноструктурному анализу, но мне кажется, что здесь большие перспективы и к QMMD-approach. И вы может быть, даже добьетесь большего, зная конечно рентген хорошего разрешения. Итак, я призываю членов ученого совета с открытой душой и сердцем голосовать за эту работу. Спасибо.

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**

Спасибо, Александр Габибович. Кто еще хочет выступить? Вероятно, все понятно. Вам заключительное слово, пожалуйста.

**Д.С. Билан:**

Я, конечно, хочу поблагодарить всех присутствующих в этой аудитории за то, что уделили время моей работе. Большое спасибо хочу сказать своим официальным оппонентам Черняку Борису Викторовичу и Воротникову Александру Вячеславовичу за очень хорошие слова о моей работе и критические замечания, которые, безусловно, тоже очень важны и нужны для дальнейших каких-то планов. А также Савицкого Александра Павловича, представителя ведущей организации, за не менее теплый отзыв. Хочу поблагодарить свой большой коллектив, в котором я работаю. Сейчас это уже различные лаборатории и группы, но, тем не менее, исторически мы очень дружны и очень тесно взаимодействуем друг с другом. Хочется сказать большое спасибо своему научному руководителю, потому что за эти годы Всеволод Вадимович Белоусов действительно стал для меня учителем. И личным примером демонстрировал мне решение различных проблем научных, часто не только научных. Поэтому эти годы были очень интересны, а главное плодотворны. И наконец, особенно приятно, что в аудитории присутствует моя семья. Благодарен родителям, потому что они сыграли важную роль в моей жизни, в том числе помогли мне с выбором профессии, которая

сейчас мне очень нравится. Спасибо жене, которая на финальных этапах подготовки диссертации, материалов, сыграла огромную роль, помогая мне.  
Я благодарен всем присутствующим, еще раз спасибо за внимание.

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**

Спасибо. Предлагается следующий состав счетной комиссии, без имен, отчеств: Зубов, Уткин, Олейников. Есть ли отводы, самоотводы? Не вижу. Кто за это предложение, прошу поднять руки. Против? Воздержавшихся? Нет. Спасибо. Тогда небольшой перерыв на голосование.

(проводится голосование)

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**

У нас готовы результаты, да?

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

У нас готовы, да. Результаты заседания счетной комиссии. Билан Дмитрий Сергеевич. Присутствовало на заседании двадцать три, роздано бюллетеней двадцать три, «ЗА» - двадцать три, «ПРОТИВ» и «НЕДЕЙСТВИТЕЛЬНЫХ» нет.

**Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:**

Прошу утвердить.

(Проводится голосование. Протокол счетной комиссии утверждается единогласно).

(Проводится голосование по проекту заключения диссертационного совета. Заключение совета принимается единогласно).

Заместитель председателя  
диссертационного совета  
Член-корр. РАН



Липкин Валерий Михайлович

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
Доктор физ.-мат. наук



Олейников Владимир Александрович