ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 26 февраля 2020 г. №4

О присуждении **Шохиной Арине Геннадиевне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Генетически кодируемый индикатор для регистрации редокс-статуса пула глутатиона на основе красного флуоресцентного белка mCherry» по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология принята к защите 4 декабря 2019 г., протокол №23 диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (117997 Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул.Миклухо-Маклая, д.16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России №75/нк от 15 февраля 2013 года.

Соискатель − Шохина Арина Геннадиевна, 1991 года рождения. В 2014 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова по специальности «биохимия». В 2018 году соискатель окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук. В настоящий момент работает младшим научным сотрудником в группе Метаболических основ патологии отдела Метаболизма и редокс-биологии в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в группе Метаболических основ патологии отдела Метаболизма и редокс-биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат биологических наук **Билан Дмитрий Сергеевич**, с.н.с., руководитель группы Метаболических основ патологии отдела Метаболизма и редокс-биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты **Плотников Егор Юрьевич**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, и **Савицкий Александр Павлович**, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, дали ***положительные*** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России), Москва, в своем ***положительном*** заключении, подписанном д.б.н., доцентом Лазаревым Василием Николаевичем - заведующим отделом клеточной биологии, заведующим лабораторией генной инженерии, и утвержденном д.б.н., проф., академиком РАН Говоруном Вадимом Марковичем - генеральным директором ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, указала, что диссертационная работа Шохиной Арины Геннадиевны является квалифицированной научной работой высокого уровня и соответствует всем критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 №842), а сама диссертантка заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 6 публикаций, в том числе 6 работ по теме диссертации общим объемом 8 печ.л., опубликованных в рецензируемых научных изданиях из перечня, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах в диссертации отсутствуют. Работы по теме диссертации, в которые Шохина А.Г. внесла основной или значительный вклад:

1) **Shokhina AG**, Kostyuk AI, Ermakova YG, Panova AS, Staroverov DB, Egorov ES, Baranov MS, van Belle GJ, Katschinski DM, Belousov VV, Bilan DS. “Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry”, *Redox Biol*, 2019; 21:101071.

2) **Шохина А.Г.**, Белоусов В.В., Билан Д.С. «Генетически кодируемый биосенсор roKate для регистрации редокс-состояния пула глутатиона», *Вестник РГМУ*, 2019; 1: 94–101.
3) Ermakova YG, Pak VV, Bogdanova YA, Kotlobay AA, Yampolsky IV, **Shokhina AG**, Panova AS, Marygin RA, Staroverov DB, Bilan DS, Sies H, Belousov VV. "SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range", *Chem Commun (Camb)*, 2018; 54(23): 2898-2901.
4) В.В. Белоусов, **А.Г. Шохина**, А.С. Панова, Д.С. Билан «Регистрация динамики соотношения НАД+/НАДН в тканях эмбрионов рыб Danio rerio с помощью генетически кодируемого биосенсора», *Вестник РГМУ,* 2018; 1: 74-55.
5) Ermakova YG, Lanin AA, Fedotov IV, Roshchin M, Kelmanson IV, Kulik D, Bogdanova YA, **Shokhina AG**, Bilan DS, Staroverov DB, Balaban PM, Fedotov AB, Sidorov-Biryukov DA, Nikitin ES, Zheltikov AM, Belousov VV. "Thermogenetic neurostimulation with single-cell resolution", *Nat Commun*, 2017; 8: 15362.
6) Билан Д.С., **Шохина А.Г.**, Лукьянов С.А., Белоусов В.В. (2015). Основные редокс-пары клетки. *Биоорг. хим.* 41 (4), 385–402.

На диссертацию поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. Плотникова Е.Ю. – положительный, содержит следующие замечания:

1. Поскольку вещество DMF может оказывать разнонаправленные эффекты на соотношение окисленной и восстановленной формы глутатиона, насколько можно быть уверенным, что соотношение будет меняться именно так, как постулирует в работе диссертант. В частности, не различаются ли абсолютные значения (а не нормализованный сигнал) у клеток, обработанных DMF и DMSO.

2. Каким образом осуществлялась таргетная доставка в митохондрии (и наоборот в цитоплазму) сенсоров Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 или фермента DAO. А также известно ли, насколько хорошо в митохондрии проникает субстрат DAO, D-норвалин.

3. Оценивалось ли в экспериментах на Danio rerio, насколько глубоко в ткани проникает экзогенная перекись и можно ли детектировать флуоресценцию сенсора в глубоколежащих слоях клеток.

4. Термин гипоксия в отношении использованной концентрации кислорода (0%) не вполне корректный, при такой концентрации правильнее говорить об аноксии.

Отзыв официального оппонента д.х.н. Савицкого А.П. – положительный, содержит следующие замечания:

1. Можно отметить недостаточную изученность механизмов изменения флуоресценции красных белков в разработанных соискателем индикаторах. Так,

например, следовало бы изучить *in vitro* pH-зависимость сенсора Grx1-roCherry в окисленном состоянии и сопоставить с исходным белком, поскольку измеренное автором значение pK 6,7 для хромофора резко отличается от 4,5 для исходного белка. Поэтому, наиболее вероятно, что значительное уменьшение коэффициента экстинкции в сенсоре при фиксированном значении pH 7 является кажущимся, а окисление цистеинов в структуре Grx1-roCherry может привести к обратному смещению pK в кислую область и увеличить кажущийся коэффициент экстинкции.

2. Дополнительно картину могло бы прояснить измерение времен жизни, так как оно должно по-разному проявиться при измерении степени протонирования хромофора, в этом случае время жизни не должно изменяться, и при измерении подвижности хромофора, приводящей к безызлучательной дезактивации. В этом случае должно произойти изменение времени жизни. Понимание этих механизмов могло бы способствовать более рациональному выбору стратегии мутагенеза в области хромофора.

Отзыв ведущей организации «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России» – положительный, принципиальных замечаний не содержит, обращает внимание соискателя на следующие моменты:

1. В работе встречаются стилистические погрешности, а также пунктуационные ошибки.

2. Обзор литературы дает полное представление о месте глутатиона в современной редокс-биологии, стилистически хорошо написан, однако, занимает практически половину объема диссертационной работы.

3. В разделе 3.2.1 «Получение препарата очищенного белка» приведена методика выделения целевого белка из колоний, выросших на твердом агаре. Нигде в тексте не дается пояснений, почему для этого не используется жидкая культура.

4. Автор работы использует целый ряд химических соединений для тестирования работы биосенсора: пероксид водорода, дихлороацетат и другие. Однако остается неясным, проводилось ли определение цитотоксичности этих соединений в выбранных концентрациях по отношению к клеточным линиям.

Выбор официальных оппонентов, а также представителей ведущей организации обоснован наличием у них значительного опыта исследовательской работы в областях, близких к тематике диссертационной работы, таких как: создание и изучение свойств флуоресцентных генетически кодируемых меток и индикаторов;

разработка плазмидных векторов и получение рекомбинантных белков, влияющих на редокс-состояние клетки; исследование молекулярных основ ишемических повреждений тканей с акцентом на роли митохондрий в этом процессе. Научные достижения официальных оппонентов и представителей ведущей организации подтверждаются публикациями в ведущих российских и международных научных изданиях. Таким образом, высокая квалификация и 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 исследований соискателем разработан новый молекулярный инструмент, Grx1-roCherry, расширяющий возможности прижизненной регистрации важнейшего внутриклеточного показателя, а именно, соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона. Это первый генетически кодируемый индикатор, позволяющий детектировать динамику изменения данного соотношения по флуоресценции в красном канале. Полученный инструмент был успешно использован в приложениях на примере различных клеточных моделей и в тканях организма *D.rerio*.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что с использованием полученного индикатора Grx1-roCherry было впервые продемонстрировано в режиме реального времени, что редокс-статусы пулов глутатиона в разных клеточных компартментах могут обладать собственной независимой динамикой изменений в условиях как локального, так и генерализованного окислительного стресса. Было косвенно подтверждено, что при генерации эндогенного пероксида водорода в матриксе митохондрий имеет место его последующий транспорт между компартментами. Также был проиллюстрирован ряд отличий между клетками опухолевого и неопухолевого происхождения в возможностях систем антиоксидантной защиты и выявлен ключевой фермент, обуславливающий способность раковых клеток более эффективно противостоять локальному окислительному стрессу митохондрий.

Значение полученных соискателем результатов для практики заключается в том, что была расширена спектральная панель генетически кодируемых индикаторов для редокс-биологии. С использованием разработанного сенсора был успешно применен подход мультипараметрической микроскопии, когда флуоресцентные сигналы

нескольких индикаторов детектировали параллельно в пределах одного исследуемого объекта. Помимо этого, на примере *D.rerio* было подтверждено, что полученный индикатор с флуоресценцией в красном канале пригоден для *in vivo* имаджинга на уровне целого организма, что представляет особый интерес для всех направлений фармакологических и биомедицинских исследований, как фундаментальных, так и прикладных.

Оценка результатов исследования выявила, что достоверность экспериментальных данных сомнений не вызывает, поскольку они получены с использованием сертифицированного оборудования, приведены данные калибровок, показана воспроизводимость результатов в различных условиях. Полученные данные не противоречат друг другу.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии и планировании экспериментов, их выполнении и анализе полученных результатов. Все экспериментальные данные получены автором лично, за исключением следующих: основные экспериментальные данные по определению характеристик выделенного белка Grx1-roCherry получены совместно с сотрудником лаборатории Молекулярных технологий отдела Метаболизма и редокс-биологии Костюком А.И. (ИБХ РАН); прижизненное редокс-титрование человеческих клеток рака шейки матки, коэкспрессирующих Grx1-roGFP2 и Grx1-roCherry, было проведено Ермаковой Ю.Г. (Schlultz group-ALMF, EMBL Heidelberg). Автор лично представляла результаты работы на международных конференциях и принимала активное участие в написании и подготовке к публикации научных статей.

Таким образом, диссертационный совет заключает, что диссертация Шохиной А.Г. является законченным научно-квалификационным исследованием, вносящим вклад в развитие важной области молекулярно-биологической науки - редокс-биологии. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Диссертационная работа Шохиной Арины Геннадиевны «Генетически кодируемый индикатор для регистрации редокс-статуса пула глутатиона на основе красного флуоресцентного белка mCherry», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология, соответствует всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением 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).

На заседании 26 февраля 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Шохиной А.Г. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 5 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации – 03.01.03, молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 19, против - 1, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель диссертационного совета
д.х.н., академик РАН
Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь диссертационного совета
д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

«27» февраля 2020 г.

МП