

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 29.04.2016 № 209/388

О присуждении **Бубликову Григорию Сергеевичу**, гражданину Российской Федерации
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация **«Фотофизические свойства флуоресцентных маркеров iRFP713, iRFP
682 и iRFP 670, созданных на основе бактериальных фитохромов»** по специальности
03.01.03 – "Молекулярная биология" **принята к защите** 19.02.2016 протокол № 204/383
диссертационным советом Д 002.230.01 на базе Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, адрес:
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4, утвержденным приказом Минобрнауки
РФ № 105/нк от 11.04.2012.

Соискатель Бубликов Григорий Сергеевич 1988 года рождения.

В 2012 году соискатель окончил Физический факультет Санкт-Петербургского
государственного университета с присвоением квалификации "магистр физики".

С 2012 года работает в Лаборатории структурной динамики стабильности и фолдинга
белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт
цитологии Российской академии наук старшим лаборантом-исследователем.

С 06.11.2012 по 05.11.2015 г. проходил очную аспирантуру на базе Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской
академии наук. Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры.

Диссертация выполнена в Лаборатории структурной динамики, стабильности и
фолдинга белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт цитологии Российской академии наук.

Научные руководители:

1. кандидат биологических наук **Степаненко Олеся Викторовна** Федеральное
государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии
наук, Лаборатория структурной динамики стабильности и фолдинга белков, старший
научный сотрудник и
2. доктор физико-математических наук, профессор **Туроверов Константин
Константинович**, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт

цитологии Российской академии наук, Лаборатория структурной динамики стабильности и фолдинга белков, заведующий лаборатории.

Официальные оппоненты:

Лукьянов Константин Анатольевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, заведующий Лаборатории биофотоники,

Васин Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий Лаборатории структурной и функциональной протеомики,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" Федеральное государственное бюджетное учреждение Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, Ленинградская область, в своем положительном заключении, составленном Орловым Юрием Николаевичем, доктором физико-математических наук, ведущим научным сотрудником Отдела молекулярной и радиационной биологии ПИЯФ НИЦ «Курчатовский институт» и утвержденном заместителем директора по науке ПИЯФ НИЦ «Курчатовский институт» доктором биологических наук С.В.Саранцевой, указала, что по актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему исследований, глубине анализа и обобщения материала настоящая диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Бубликов Григорий Сергеевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» и

дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 12 работ, из них 3 статьи (2,25 печатных листов) опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Stepanenko Olesya V., Bublikov G. S., Stepanenko Olga V., Shcherbakova D. M., Verkhusha V. V., Turoverov K. K., Kuznetsova I. M. (2014). A knot in the protein structure – probing the near-infrared fluorescent protein iRFP designed from a bacterial phytochrome. *FEBS J.* 281: 2284–2298. В работе изучены спектральные свойства и структурные особенности флуоресцентного маркера iRFP713. Показано, что необратимость денатурации iRFP713 в холоформе и агрегация молекул белка при попытке ренатурации из развернутого состояния обусловлена наличием хромофора, связанного с белком ковалентно, а не узлом в структуре белка. Белок iRFP713 в апоформе сохраняет структуру, присущую холоформе белка, и способен взаимодействовать с BV.
2. Степаненко Олеся В., Бубликов Г. С., Степаненко Ольга В., Рычков Г.Н., Поварова О.И., Верхуша В.В., Туроверов К.К., Кузнецова И.М. (2015). Узлы в структуре белков. *Цитология* 57(3): 177–183. В работе дан обзор исследований структуры элементов типа узла различных белков и их влияния на процесс образования нативной конформации белка, что представляет большой интерес для понимания фолдинга белков в целом.
3. Stepanenko Olesya V., Baloban M., Bublikov G. S., Shcherbakova D. M., Stepanenko Olga V., Turoverov K. K., Kuznetsova I.M. and Verkhusha V.V. (2016) Allosteric effects of chromophore interaction with dimeric near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes. *Scientific Reports* 6: 18750: 1–13; suppl. 1–10; В работе исследованы спектральные свойства, квантовый выход и молекулярная яркость флуоресценции димерных флуоресцентных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670, созданных на основе бактериальных фитохромов. Показано, что спектральные свойства димерных NIR FP в значительной мере определяются межмономерным и междоменным аллостерическим влиянием цистеиновых остатков, которое препятствует или способствует ковалентному связыванию BV во втором мономере димерных NIR FPs. Создана мутантная форма iRFP713/V256C, которая имеет самый высокий из всех созданных на сегодняшний день NIR FP квантовый выход флуоресценции и яркость флуоресценции *in vivo* и *in vitro*.

Вклад диссертанта в публикациях является определяющим.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Руководителя группы спектроскопии белка ФГБУН Институт белка Российской академии наук, Пущино, кандидата физико-математических наук, **Мельника Богдана Степановича**. Отзыв положительный, содержит критические замечания:

"...К недостаткам автореферата можно отнести не всегда уместный сленг и некоторые нерасшифрованные сокращения (например, FWHM). «Молекулярная яркость флуоресценции» - также неочевидный параметр, который линейно связан с квантовым выходом флуоресценции и необходимость его использования требует пояснений."

2. Главного научного сотрудника Лаборатории структурной биохимии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии им. А.Н. Баха» Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Лауреата Государственной премии СССР, Заслуженного деятеля науки Российской Федерации, доктора химических наук, профессора, **Курганова Бориса Ивановича**. Отзыв положительный, без замечаний.

3. Заведующей Кафедрой биофизики ФГАОУ ВО Сибирского федерального университета, Красноярск, доктора биологических наук, профессора, **Кратасюк Валентины Александровны** и старшего научного сотрудника Лаборатории биолюминесцентных биотехнологий ФГАОУ ВО Сибирского федерального университета, Красноярск, кандидата физико-математических наук, **Немцевой Елены Владимировны**. Отзыв положительный, без замечаний.

4. Ведущего научного сотрудника Лаборатории физики белка ФГУН Институт белка Российской академии наук, Пущино, доктора физико-математических наук, **Бычковой Валентины Егоровны**. Отзыв положительный, содержит критические замечания: "...Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных методов, адекватных поставленным задачам. Выводы диссертационной работы логично обоснованы и сформулированы. Однако в тексте наблюдается некоторое количество грамматических ошибок и несогласований, отсутствие некоторых знаков препинания и использование кальки с английского (анфолдинг), но это никак не уменьшает научной ценности полученных интересных и значимых результатов."

5. Заведующего Кафедрой общей физики, Учреждения образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», Гродно, кандидата физико-

математических наук, **Маскевича Александра Александровича**. Отзыв положительный, без замечаний.

6. Главного научного сотрудника Лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, доктора биологических наук, **Сурина Александра Михайловича**. Отзыв положительный, содержит критические замечания:

"...К небольшим недостаткам оформления можно отнести отсутствие объяснения вставки в подписи к Рис. 1(панель Б) и не указан способ определения молекулярной яркости, который еще не приобрел такую известность, как оптическая плотность или интенсивность флуоресценции."

7. Заведующего Кафедрой лазерной физики и спектроскопии, Минского государственного университета, Минск, доктора физико-математических наук, **Воропая Евгения Семеновича**. Отзыв положительный, без замечаний.

В деле имеется справка о практической значимости результатов диссертационной работы Г.С. Бубликова и об их использовании в образовательном процессе студентов IV курса кафедры «Биофизика» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета. Справка утверждена заведующим кафедры «Биофизика», доктором физико-математических наук **Алексеем Николаевичем Скворцовым**.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что Лукьянов Константин Анатольевич, заведующий Лаборатории биофотоники, является одним из ведущих специалистов в мире в области флуоресцентных биомаркеров на основе флуоресцентных белков;

Васин Андрей Владимирович, заведующий Лаборатории структурной и функциональной протеомики, является специалистом в области влияния структуры белков на их функциональные свойства.

Отдел молекулярной и радиационной биологии Национального исследовательского центр "Курчатовский институт" Федерального государственного бюджетного учреждения Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова является одним из ведущих учреждений России в области структурной протеомики, изучения роли структуры белков в проявлении их функций.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- **разработана** новая научная концепция о механизмах формирования спектров флуоресценции ближнеинфракрасных маркеров iRFP 713, iRFP 682 и iRFP 670, созданных на основе бактериальных фитохромов;
- **предложена** оригинальная научная гипотеза, получившая экспериментальное подтверждение, о междоменном аллостерическом влиянии встраивания биливердина в один домен двухдоменного флуоресцентного маркера на связывание молекулы биливердина со вторым мономером белка;
- **доказано**, что необратимость денатурации iRFP713 в холоформе и агрегация молекул белка при попытке ренатурации из развернутого состояния обусловлена наличием хромофора, связанного с белком ковалентно. Белок iRFP713 в апоформе сохраняет структуру, присущую холоформе белка, и способен взаимодействовать с BV в соотношении 1:1. Конформация и микроокружение хромофора в образующемся комплексе и в нативном холобелке совпадают; наличие узла в структуре белка не препятствует эффективному рефолдингу iRFP713; BV, встроенный в карман GAF домена, но не связанный ковалентно или связанный ковалентно с Cys 15 NIR FP, имеет длинноволновые полосы поглощения и флуоресценции; BV, встроенный в карман GAF домена и ковалентно связанный с Cys 256 NIR FP, имеет коротковолновые полосы поглощения и флуоресценции, более высокий квантовый выход флуоресценции по сравнению с BV, связанным с Cys 15 или не связанным ковалентно

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- **доказаны** положения, вносящие вклад в расширение представлений о фотофизических свойствах димерных флуоресцентных биомаркеров на основе бактериальных фитохромов;
- **применительно к проблемам диссертации результативно использован** комплекс современных методов молекулярной биологии, включающих получение рекомбинантных белков и их очистку, УФ спектрометрию, круговой дихроизм, равновесный микродиализ для определения констант связывания, регистрацию денатурационных и ренатурационных зависимостей, полученных при изменении содержания денатуранта в растворе;
- **изложены** новые экспериментальные данные свидетельствующие о неучастии узла в процессах денатурации – ренатурации флуоресцентных маркеров, созданных на основе бактериальных фитохромов;
- **изучены** структурные изменения флуоресцентных маркеров, созданных на основе бактериальных фитохромов в холо- и апо-форме;

- **раскрыты** особенности влияния биливердина, связанного с одним мономером димерных флуоресцентных маркеров, на связывание второй молекулы биливердина со вторым мономером;
- **изучено** влияние хромофора на процессы сворачивания – разворачивания флуоресцентных маркеров, созданных на основе бактериальных фитохромов;
- **проведена оценка** констант связывания молекул биливердина с апо-белком.

Значение полученных соискателем результатов для практики подтверждается тем, что:

- **разработаны и внедрены** в практику научного исследования методики изучения влияния связывания одной молекулы биливердина с одним мономером димерного белка на связывание второй молекулы биливердина с другим мономером белка;
- **представлены** новые данные о зависимости спектральных характеристик димерных флуоресцентных маркеров на основе бактериальных фитохромов от присутствия цистеиновых остатков в положении 15 и 256.

Оценка достоверности результатов исследования:

- **результаты**, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании, выбор использованных методов обоснован спецификой работы и поставленными в работе задачами;
- **теория** об аллостерическом влиянии связывания биливердина с одним мономером димерного флуоресцентного белка на связывание второй молекулы биливердина со вторым мономером белка построена на известных и проверенных литературных фактах и данных об аллостерическом действии связывания лигандов с белками;
- **идея базируется** на анализе современных литературных данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала;
- **использовано** сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике;
- **установлено**, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным;
- **использованы** современные экспериментальные подходы (получение и очистка рекомбинантных белков, характеристика полученных препаратов с помощью электрофореза и хроматографически, спектроскопические методики, в том числе разработанные с участием автора диссертации, круговой дихроизм, анализ пространственной структуры белков, содержащихся в Protein Data Bank, с использованием

стандартных программ, имеющихся в Protein Data Bank, а также программ, разработанных в Лаборатории СДС и ФБ, в которой выполнялось диссертационное исследование).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации экспериментальных данных, полученных с помощью современных молекулярно-биологических методов. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований на отечественных и международных научных конференциях, в подготовке статей и тезисов по теме диссертации.

На заседании 29.04.2016 года диссертационный совет принял решение **ПРИСУДИТЬ Бубликову Григорию Сергеевичу** ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - "Молекулярная биология".

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 7 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета проголосовали:

"за" - 17, "против" – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель

Диссертационного совета Д 002.230.01
доктор биологических наук, профессор



 А.Л. Юдин

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01
кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

«04» мая 2016 г.