

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

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 доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 12 октября 2016 года № 10

О присуждении **Ямпольскому Илье Викторовичу**, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора химических наук.

Диссертация «Строение и механизмы функционирования новых субстратов биолюминесценции (люциферинов) и хромофоров флуоресцентных белков» по специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия принята к защите 08 июня 2016 г., протокол №7 диссертационным советом Д 002.019.01 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, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Ямпольский Илья Викторович, 1979 г. рождения. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук "Синтез и свойства хромофоров белков семейства зеленого флуоресцентного белка" защитил в 2009 году в диссертационном совете, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Работает старшим научным сотрудником, руководителем группы синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Диссертация выполнена в группе синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научные консультанты – Лукьянов Сергей Анатольевич, доктор биологических наук, академик РАН, заведующий отделом геномики и постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук; Гительзон Иосиф Исаевич, доктор медицинских наук, академик РАН, советник РАН Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. Смушкевич Юрий Исаевич, доктор химических наук, профессор кафедры органической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»;

2. Исмаилов Анвар Джураевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии Биологического факультета Федерального

государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»;

3. Загайнова Елена Вадимовна, доктор медицинских наук, директор НИИ Биомедицинских технологий Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва, в своем положительном заключении, составленном Савицким Александром Павловичем, доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией физической биохимии, указала, что по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне диссертация Ямпольского Ильи Викторовича полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями постановления Правительства РФ от 24.04.16 №335), а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Соискатель имеет 37 опубликованных работ, из них по теме диссертации опубликовано 27 научных работ общим объёмом 20 печатных листов, в том числе 2 статьи в российских научных журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, а также 25 статей в зарубежных научных изданиях, входящих в международную базу данных Web of Science. Соискателем опубликовано 4 работы в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

1. Walker C.L., Lukyanov K.A., **Yampolsky I.V.**, Mishin A.S., Bommaris A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. Fluorescence imaging using synthetic GFP chromophores. **Current Opin. Chem. Biol.** 2015, 27, 64-74.
2. Bogdanov A.M., Mishin A.S., **Yampolsky I.V.**, Belousov V.V., Chudakov D.M., Subach F.V., Verkhusha V.V., Lukyanov S., Lukyanov K. Green fluorescent proteins are light-induced electron donors. **Nature Chem. Biol.** 2009, 5, 459-461.
3. Ivashkin P.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S., **Yampolsky I.V.** A Synthetic GFP-like Chromophore Undergoes Base-Catalyzed Autoxidation into Acylimine Red Form. **J.Org. Chem.** 2011, 76, 2782-2791.
4. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., **Yampolsky I.V.**, Solntsev K.M. Conformationally locked chromophores as a model of excited state proton transfer in fluorescent proteins. **J. Am. Chem. Soc.** 2012, 134, 6025-6032.
5. Sarkisyan K.S., **Yampolsky I.V.**, Solntsev K.M., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Tryptophan-based chromophore in fluorescent proteins can be anionic. **Scientific Reports** 2012, 2, Art. 608.
6. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Ivashkin P.E., **Yampolsky I.V.** An efficient synthetic approach to fluorescent oxazole-4-carboxylate derivatives. **Synth. Commun.** 2013, 43 (17), 2337-2342.

- 7 Baranov M.S., Solntsev K.M., Lukyanov K.A., **Yampolsky I.V.** Synthetic approach to GFP chromophore analogs from 3-azidocinnamates. Role of methyl rotors on the chromophore photophysics. **Chem. Commun.** 2013, 49 (51), 5778-5780.
- 8 Frizler M., **Yampolsky I.V.**, Baranov M.S., Stirnberg M., Gutschow M. Chemical introduction of the green fluorescence: imaging of cysteine cathepsins by an irreversibly locked GFP fluorophore. **Org. Biomol. Chem.** 2013, 11, 5913-5921.
- 9 Petushkov V.N., Tsarkova A.S., Dubinnyi M.A., Rodionova N.S., Marques S.M., Esteves da Silva J. C.G., Shimomura O., **Yampolsky I.V.** CompX, a luciferin-related tyrosine derivative from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. Structure elucidation and total synthesis. **Tetrahedron Lett.** 2014, 55, 460-462.
- 10 Petushkov V.N., Dubinnyi M.A., Rodionova N.S., Nadezhdin K.D., Marques S.M., Esteves da Silva J. C.G., Shimomura O., **Yampolsky I.V.** AsLn2, a luciferin-related modified tripeptide from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. **Tetrahedron Lett.** 2014, 55, 463-465.
- 11 Petushkov V.N., Dubinnyi M.A., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Baranov M.S., Kublitski V.S., Shimomura O., **Yampolsky I.V.** A novel type of luciferin from Siberian luminous earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2014, 53 (22), 5566-5568.
- 12 Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov K.A., **Yampolsky I.V.** Red-shifted fluorescent aminated derivatives of conformationally locked GFP chromophore. **Chem. Eur. J.** 2014, 20 (41), 13234-13241.
- 13 Dubinnyi M.A., Tsarkova A.S., Petushkov V.N., Kaskova Z.M., Rodionova N.S., Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Baranov M.S., Mineev K.S., **Yampolsky I.V.** Novel Peptide Chemistry in Terrestrial Animals: Natural Luciferin Analogues from the Bioluminescent Earthworm *Fridericia heliota*. **Chem. Eur. J.** 2015, 21, 3942-3947.
- 14 Dubinnyi M.A., Kaskova Z.M., Rodionova N.S., Baranov M.S., Gorokhovatsky A.Y., Kotlobay A., Solntsev K.M., Tsarkova A.S., Petushkov V.N., **Yampolsky I.V.** Novel mechanism of bioluminescence: oxidative decarboxylation of *Fridericia luciferin*. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2015, 54, 7065-7067.
- 15 Purtov K.V., Petushkov V.N., Baranov M.S., Mineev K.S., Rodionova N.S., Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Petunin A.I., Bondar V.S., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Oba Y., Oba Y., Arseniev A.S., Lukyanov S., Gitelson J.I., **Yampolsky I.V.** The chemical basis of fungal bioluminescence. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2015, 54, 8124-8128.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента Смушкевича Ю.И., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- Ошибка в схеме на стр. 71 диссертации.

- Приведенное в диссертации значение pK_a 20 для индола определено в диметилсульфоксиде. Поскольку речь идет о живых организмах следует использовать значение pK_a 16,9.

- Вывод «первые показана возможность депротонирования индольного остатка в составе белка в физиологических условиях», на мой взгляд, неудачно сформулирован: pK_a индольного остатка в этой молекуле равно 12, а pK_{bh} первичной аминогруппы - 10,6, следовательно на 25 молекул неионизированного индола придется только 1 молекула ионизированного. В случае триптофана, входящего в состав белка, на 105,4 молекулы неионизированного индола - 1 молекула ионизированного.

- Работа хорошо написана и хорошо оформлена, но в ней, как и во всякой другой большой работе, присутствуют чисто технические ошибки и неудачные выражения, например: «наблюдается батохромный сдвиг около 60 нм с РКа 12,4» (стр. 68); «рКа боковой цепи лизина в растворе равен 12.4» (стр. 72). На самом деле, рКа боковой цепи лизина равен 35, а 12.4 это рКbh.

2. Отзыв официального оппонента Исмаилова А.Д., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- ...необходимо отметить, что использование в качестве параметра окислительной дегградации хромофоров времени полураспада может дать только общую характеристику процесса, но недостаточно для строгой оценки стадий и интермедиатов...

- Как основное замечание можно рассматривать отсутствие в литературном обзоре сведений о механизмах свечения червей и грибов, которые, даже в ущерб светляковой, бактериальной или целентеразиновой биолюминесценции, были бы более уместны в данной работе.

3. Отзыв официального оппонента Загайновой Е.В., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- Стр. 5 (введение к обзору литературы): «При помощи случайного мутагенеза была разработана обширная цветовая палитра ФБ, однако не все из них нашли практическое применение в связи с ограничениями, обусловленными размером белка (27 kDa), а также небольшим количеством биологически доступных ароматических аминокислот, значительно сужающим многообразие результирующих белков». Неудачная формулировка. Видимо, имелась в виду олигомеризация, характерная для многих вариантов флуоресцентных белков.

- По второй части литературного обзора нет обобщающего заключения с обозначением нерешенных проблем и дальнейших перспективных научных задач. Для упрощения чтения диссертации следовало указать в оглавлении подразделы литературного обзора.

- В главах 3.2 и 3.3 (Результаты и обсуждение) вводные разделы «Обоснование исследования» частично перекрываются между собой, а также предоставляют общие сведения о флуоресцентных белках, не относящиеся непосредственно к экспериментальной работе автора, описанной в этих главах. На мой взгляд, было бы правильнее дать эту информацию в разделе «Литературный обзор».

- Стр. 106: «Таким образом, была установлена структура нового люциферина, являющегося ключевым компонентом новой АТФ-зависимой биолюминесцентной системы сибирского дождевого червя *Fridericia heliota*». Можно ли называть этого червя «дождевым»?

- Большой объем работы не позволил выявить все опечатки и неточности форматирования. Так, в Таблице 3.2.2 диссертации и соответствующей Таблице 2.1 автореферата неправильно отображается символ в первой колонке. На Рисунке 3.8.8 надписи «Гиспидин» и «Люциферин» отображаются не полностью.

4. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- В обзоре литературы не хватает завершающего обобщения, которое бы подводило читателей к целям и задачам данной диссертационной работы.

- Не для всех твердых соединений приведены температуры плавления.

- Для соединений, очищенных колоночной хроматографией, не указаны факторы удерживания (Rf).

- Некоторые приведенные схемы, рисунки и таблицы имеют непереведенные английские термины, для которых нет расшифровки в списке сокращений.

- Имеются неточности в оформлении текста диссертации, например, часть Рисунка 3.4.6 (с. 83) выходит за границы листа, а на Рисунке 3.8.8 (с.137) есть нечитаемые надписи.

- В работе встречается ряд грамматических ошибок (пропущенные запятые).

5. Отзыв на автореферат, составленный Игорем Викторовичем Коробко, д.б.н., проф. РАН, зав. лабораторией молекулярной онкогенетики, зам. директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук. Отзыв положительный и не содержит замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих теме представленной диссертации. Это подтверждается наличием у них значительного количества публикаций в ведущих российских и международных научных журналах и изданиях. Стоит отметить, что сотрудниками ФИЦ Биотехнологии РАН ведутся работы по изучению флуоресцентных белков семейства GFP. Научные интересы Загайновой Е.В. и сотрудников руководимого ей института связаны с использованием флуоресценции и биолуминесценции для изучения процессов в клетках и тканях. Исмаилов А.Д. известен своими фундаментальными и прикладными работами по биолуминесценции. Смушкевич Ю.И. является одним из ведущих специалистов в области органической химии, в частности, химии индола и его производных. Наличие солидного опыта и высокой квалификации в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований соискателю удалось совершить ряд открытий в биоорганической химии: установление строения и механизма действия люциферина червя *Friderica heliota*, а также люциферина высших грибов. Наряду с этим, впервые были установлены химические структуры предшественников люциферина люминесцентных грибов и выявлены механизмы их конверсии в люциферин. Автором также внесен большой вклад в изучение фундаментальных аспектов химии флуоресцентных белков. В частности, создан флуоресцентный краситель нового типа на основе конформационно-фиксированного хромофора зеленого флуоресцентного белка GFP. С использованием синтетических модельных соединений детально изучен механизм автоокисления GFP-подобного зеленого хромофора с образованием красного хромофора DsRed-типа, обнаруженного в составе ряда флуоресцентных белков. Впервые получен

флуоресцентный белок, содержащий депротонированный остаток триптофана в составе хромофора флуоресцентного белка.

Диссертация Ямпольского И.В. является важным научным исследованием и вносит существенный вклад в фундаментальные представления о химических механизмах излучения света живыми организмами. Изученные автором новые флуоресцентные красители, белки, а также новые биолюминесцентные системы могут быть использованы для создания технологий визуализации биохимических и физиологических процессов и скрининга лекарственных кандидатов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работы выполнены на высоком экспериментальном уровне, результаты воспроизводимы в различных условиях, а методы исследования, предложенные и разработанные соискателем, прошли независимую экспериментальную проверку в лабораториях по всему миру и используются повсеместно.

Личный вклад соискателя состоит в том, что он принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов. Весь экспериментальный материал получен лично автором и руководимыми им аспирантами и студентами, за исключением экспериментов по выделению природных веществ из биомассы исследуемых организмов, выполненных совместно с сотрудниками Института биофизики СО РАН В.Н. Петушковым, Н.С. Родионовой и К.В. Пуртовым. Работы по мутагенезу флуоресцентных белков и молекулярному клонированию выполнялись в сотрудничестве с лабораторией биофотоники ИБХ РАН под руководством К.А. Лукьянова. Фотохимические исследования проводились совместно с К. Солнцевым (университет Джорджии, США). Анализ полученных данных проведен лично соискателем, кроме того, подготовка основных публикаций по диссертационной работе выполнена лично или при активном участии автора.

На заседании 12 октября 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Ямпольскому Илье Викторовичу ученую степень доктора химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 8 докторов наук (по специальности диссертации 02.00.10 - биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени - 22, против присуждения учёной степени - 1, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физ.-мат.наук



Иванов Вадим Тихонович

Олейников Владимир Александрович