

## **ОТЗЫВ**

**Официального оппонента**

**Загайновой Елены Вадимовны,**

**доктора медицинских наук, профессора РАН,**

**на диссертационную работу Ямпольского Ильи Викторовича**

**«Строение и механизмы функционирования новых субстратов  
биолюминесценции (люциферинов) и хромофоров флуоресцентных  
белков»,**

**представленную на соискание ученой степени доктора химических наук  
по специальности: 02.00.10 – «биоорганическая химия»**

Раскрытие структуры хромофоров и люциферинов с целью понимания механизмов флуоресценции и биолюминесценции и создания синтетических аналогов является актуальным направлением исследований целого ряда наук: химии, биологии, физики. Актуальность задачи обусловлена как ее фундаментальным значением – появляется возможность раскрыть неизвестные механизмы свечения организмов, проследить их эволюционную связь, так и прикладным – раскрытие структуры и свойств природных соединений позволяет создавать синтетические соединения, возможно с улучшенной структурой и улучшенными свойствами для задач визуализации живых систем на различных уровнях организации (от клеток до человека).

В связи с этим, целью диссертационной работы Ямпольского И.В. явилось изучение химических механизмов, лежащих в основе излучения света некоторыми живыми организмами, а также исследование возможностей их применения.

В ходе работы были изучены механизмы созревания хромофора красного флуоресцентного белка, создан флуоресцентный краситель нового типа на основе конформационно-фиксированного хромофора зеленого флуоресцентного белка, выделен и установлено строение и механизм действия люциферина *Fridericia heliota* и его структурных аналогов, выделен и установлено строение и механизм действия люциферина высших грибов.

Работа изложена в традиционной форме и содержит главы «Введение», «Обзор литературы», «Результаты и обсуждение», «Экспериментальная часть» и «Выводы».

В первой части обзора литературы изложены успехи и проблемы в области разработки новых хромофоров и новых методов придания конформационной жесткости, приводящих к возникновению флуоресценции в ответ на специфическое распознавание, рассмотрено применение синтетических хромофоров флуоресцентных белков для флуоресцентного имиджинга, а также некоторые исследования флуоресценции синтетических

хромофоров в растворах, которые потенциально, могут быть применимы для имиджинга. Приведены примеры РНК аптамеров, специфически связывающихся и активирующих флуоресценцию синтетических аналогов хромофоров флуоресцентных белков, проанализированы их преимущества и недостатки, описаны принципы визуализации комплексов белок-хромофор. В конце первой части обозначены основные перспективы создания новых хромофоров, в частности, «красных» и эффективно связывающихся с партнерами.

Во второй части обзора описаны известные на сегодняшний день биолюминесцентные системы и разобраны возможные варианты синтеза аналогов природных люциферинов: светляка (Д-люциферин), системы на основе целентеразина, фотопротеины, система бактерий.

Глава результаты и обсуждение.

В подглаве 3.1 предложен совершенно новый подход к синтезу красных хромофоров из GFP введением основных остатков вблизи позиции 65. Красные флюорофоры открывают перспективу прижизненной визуализации глубоких патологических процессов: опухолей внутренних органов, метастазов.

В подглаве 3.2 – конформационно-фиксированный хромофор GFP – разработан метод пространственной фиксации подвижного бензилиденового фрагмента в составе хромофора GFP. Доказано, что введение этого заместителя увеличивает квантовый выход флуоресценции хромофора GFP на 3 порядка, что несомненно имеет практическую значимость для визуализации малых событий в клетке и делает возможность *in vivo* наблюдения при генетическом маркировании.

В подглаве 3.3 автор доказывает, что хромофоры флуоресцентных белков на основе триптофана могут существовать в депротонированном состоянии. Показан новый способ контроля спектральных свойств флуоресцентных белков – переход между протонированным и депротонированным Trp66.

В подглавах 3.4 и 3.5 выполнено исследование по расшифровке структуры нового люциферина *Fridericia heliota*. ЯМР анализ показал, что обнаруженный автором ComX является структурным компонентом люциферина, но не обладает флуоресценцией. Далее автор предлагает методики синтеза различных потенциальных аналогов природного люциферина *Fridericia heliota* и в итоге, выделяет вещество 3.5.1, обладающее сходными биолюминесцентными свойствами с природным люциферинном.

В подглаве 3.6 раскрыт механизм работы целостной биолюминесцентной системы *Fridericia heliota*, который является совершенно новым, впервые выявленным в природе. Он основан на окислительном декарбоксилировании фрагмента лизина люциферина.

Раскрытие структуры нового люциферина и синтез его аналога в комплексе с новым механизмом биолюминесценции дает в руки исследователей новую надежную систему визуализации в биологических системах. Представляется, что синтетический аналог природного люциферина, полученный автором, станет доступным биохимическим реактивом.

В подглаве 3.7 показана новая пептидная химия предшественников люциферина червя, что так же проливает свет на формирование биолюминесцентной системы в эволюции.

В подглаве 3.8 раскрывается еще один механизм биолюминесценции биологических систем, в частности грибов. Опровергается существовавшая до сегодняшнего дня теория биолюминесценции грибов и предлагается новая – утверждается, что предлюциферин грибов является гиспидин, а способность к биолюминесценции обусловлена наличием специфических ферментов – гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы.

Глава 4 посвящена материалам, оборудованию и программному обеспечению.

Подробно и воспроизводимо описаны разработанные автором методики синтеза и автоокисления синтетического хромофора GFP с образованием DsRed подобного красного хромофора, создания конформационно-фиксированного хромофора GFP, флуоресцентного белка WasCFP с ионизированным остатком триптофана в составе хромофора, методика расшифровки структуры люциферина *F. heliota*, синтез люциферина *F. heliota* и его аналогов, синтез люциферина грибов и способ расшифровки функционирования их биолюминесцентной системы.

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». На мой взгляд, неудачная формулировка, смешивающая несколько разных утверждений. Все белки семейства GFP имеют указанный размер мономера (27 кДа), т.е. это является единым ограничением их использования, независимо от цвета. Видимо, имелась в виду олигомеризация, характерная для многих вариантов флуоресцентных белков. Далее, «небольшое количество биологически доступных ароматических аминокислот», конечно же, ограничивает цветовое разнообразие (что несколько конфликтует с началом фразы про «обширную цветовую палитру ФБ»), но никак не практическое применение полученных мутантных вариантов.

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 биoluminesцентной 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.

Высказанные замечания носят рекомендательный характер и ни в коей мере не снижают значимость полученных диссертантом результатов, каждому из которых можно присвоить гриф «впервые в мире». Подводя итог анализу диссертации И.В.Ямпольского, следует заключить, что работа является оригинальным экспериментальным исследованием, выполненным на высоком методическом и теоретическом уровне. Диссертация написана хорошим, богатым языком и содержит большое количество наглядных схем и иллюстраций, что систематизирует материал и облегчает его восприятие.

Предложенные автором в диссертации методики синтеза новых хромофоров с улучшенными свойствами и синтетических аналогов новых люциферинесцентных белков несомненно являются прорывными и позволят исследователям получить новые инструменты маркирования живых систем для визуализации на разных уровнях организации от структур клетки до целого организма. Кроме того, новые фундаментальные знания о работе и строении новых биoluminesцентных систем внесут свой вклад в понимание эволюции живых организмов.

Результаты диссертации доложены на ведущих международных конференциях, отражены в публикациях в рейтинговых отечественных и зарубежных журналах. Надо отметить, что список публикаций автора очень впечатляющий. Их достоверность, а также обоснованность выводов не вызывает сомнения.

В целом диссертационная работа И.В.Ямпольского оставляет замечательное впечатление по актуальности, по глубине анализа

современного состояния проблемы и путей ее решения, по объему выполненных экспериментальных исследований и по значимости для мировой науки полученных результатов. По новизне полученных результатов, их фундаментальной и практической значимости, диссертационная работа Ямпольского Ильи Викторовича соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Официальный оппонент

Загайнова Елена Вадимовна

Доктор медицинских наук, профессор РАН

Директор НИИ Биомедицинских технологий

ФГБОУ ВО Нижегородская государственная

Медицинская академия

Министерства Здравоохранения

Российской Федерации

Адрес: 603950, Нижний Новгород

пл. Минина и Пожарского, 10/1

тел. (831)-439-09-43, e-mail: [rector@nizhgma.ru](mailto:rector@nizhgma.ru)

Подпись Е.В.Загайновой заверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ВО НИЖГМА

Минздрава России, д.б.н.



*Ступнива*

/Н.Н.Андреева/