

О Т З Ы В

официального оппонента Смушкевича Юрия Исаевича, доктора химических наук, профессора кафедры органической химии РХТУ им. Д.И.Менделеева на диссертационную работу Ямпольского Ильи Викторовича «Строение и механизмы функционирования новых субстратов биолюминисценции (люциферин) и хромофоров флуоресцентных белков», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия

Изучение биолюминисценции и флуоресценции живых организмов имеет как фундаментальное научное, так и практическое значение. В свете этого считаю актуальной работу Ямпольского И.В., посвященную изучению строения, синтезу, превращениям и механизмам работы хромофоров флуоресцентных белков и новых люциферин.

Рецензируемая работа построена традиционным образом, содержит обзор литературы (35 стр.), посвященный синтетическим аналогам хромофоров флуоресцентных белков и люциферинам, обсуждение результатов собственных исследований автора (100 стр.), экспериментальную часть (39 стр.), выводы и список цитируемой литературы (394 наименования).

Обсуждение результатов собственных исследований Ямпольского И.В. представлено в трех самостоятельных разделах. Первый раздел содержит обсуждение результаты работы в области зеленого флуоресцентного белка GFP. Автором осуществлен синтез ряда флуоресцентных GFP-подобных хромофоров - арилиденимидазолонов, отличающихся природой заместителя в положении 2 имидазолонового цикла и, в том числе, 3-индолилметиленденимидазолона. Далее, им было изучено превращение этих соединений в DsRed-подобный хромофор. На основании полученных при этом результатов автору удалось предложить разумный механизм созревания красного флуоресцентного белка DsRed. В этом же разделе описан также синтез зеленого красителя на основе конформационно фиксированного хромофора зеленого флуоресцентного белка GFP. Завершает этот раздел описание получения белка WasCFP, содержащего индолильный остаток, в существенной степени депротонированный по атому азота при физиологических значениях pH, с помощью сайт-направленного и случайного мутагенеза.

Второй раздел содержит обсуждение результатов работы в области люциферина билюминесцентного червя *Fridericia heliota*. Диссертанту удалось выделить, установить строение и синтезировать биохимические предшественники люциферина *Fridericia heliota*, которые представляют собой производные 2-метоксикоричной кислоты. Данные, полученные в результате этих исследований, позволили решить основную задачу – установить строение люциферина *Fridericia heliota* и его аналогов. Все они представляют собой амиды 2-метоксикоричной кислоты. Завершает этот раздел описание механизма билюминесценции червей *Fridericia heliota*: окислительное декарбоксилирование фрагмента лизина люциферина является источником энергии, а флуоресцентный фрагмент выполняет роль люминофора.

Третий раздел посвящен изучению билюминесцентных грибов. Диссертант установил строение предшественника люциферина грибов – гиспидина как E-6-(3,4-дигидроксистирил)4-гидрокси-2-Н-пиран-2-она и люциферина грибов - E-6-(3,4-дигидроксистирил)3,4-дигидрокси-2-Н-пиран-2-она. Строение последнего было подтверждено встречным синтезом

Научная новизна

1. Осуществлен синтез производных хромофора GFP.
2. Установлено, что эти хромофоры способны окисляться в присутствии оснований с образование красных хромофоров DsRed типа.
3. Предложен механизм созревания красных флуоресцентных белков DsRed типа.
4. Разработан метод получения конформационно-фиксированного хромофора зеленого флуоресцентного белка GFP.
5. С помощью сайт-направленного и случайного мутагенеза получен белок, хромофор которого содержит индольный остаток, в существенной степени депротонированный по атому азота при физиологических значениях pH.
6. Установлено строение и осуществлен синтез представителей нового класса природных соединений - производных 2-метоксикоричной кислоты.
7. Установлено строение и осуществлен синтез люциферина червя *Fridericia heliota*.
8. Предложен механизм люминесценции люциферина *Fridericia heliota*

9. Установлено строение и осуществлен синтез люциферина грибов - 6-(3,4-дигидроксистирил)3,4-дигидрокси-2-Н-пиран-2-она.

10. Установлено строение и осуществлен синтез предшественника люциферина грибов - 6-(3,4-дигидроксистирил)4-гидрокси-2-Н-пиран-2-она.

Практическое значение

1. Разработанные методы синтеза могут найти применение в лабораторной практике для получения новых соединений, пригодных для визуализации биологических объектов.

2. Можно ожидать практического применения нового красителя на основе конформационно-фиксированного хромофора зеленого флуоресцентного белка GFP.

Рецензируемая работа выполнена и обсуждена на современном научном уровне. Строение впервые полученных соединений установлено с широким привлечением спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения, а также подтверждено встречными синтезами. В виду этого основные результаты работы и сделанные на их основе выводы у меня не вызывают сомнения.

Критические замечания.

1. Ошибка в схеме на стр. 71 диссертации.

2. 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.

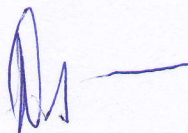
3. Вывод «впервые показана возможность депротонирования индольного остатка в составе белка в физиологических условиях», на мой взгляд, неудачно сформулирован: pK_a индольного остатка в этой молекуле равно 12, а pK_{bh} первичной аминогруппы - 10.6, следовательно на 25 молекул неионизированного индола придется только 1 молекула ионизированного. В случае триптофана, входящего в состав белка, на $10^{5.4}$ молекул неионизированного индола - 1 молекула ионизированного.

4. 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 pK_a 12,4» (стр. 68); « pK_a боковой цепи лизина в растворе равен 12.4» (стр. 72). На самом деле, pK_a боковой цепи лизина равен 3.5, а 12.4 это pK_{bh} .

Сделанные мною критические замечания не затрагивают основного содержания работы. Ямпольским И.В. выполнено блестящее исследование, решен ряд важных научных проблем, касающихся строения и механизма работы флуоресцентных белков и люциферинов, получены результаты, имеющие как научную новизну, так и практическую значимость. Все это дает мне основание считать, что по актуальности темы, новизне и практической значимости диссертационная работа Ямпольского Илья Викторовича соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. N 842 с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335.

Считаю, что Ямпольский Илья Викторович несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 биоорганическая химия.

Официальный оппонент



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

Контактная информация:

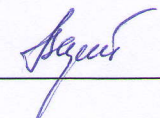
Адрес: 125047, г. Москва, Миусская площадь, д.9

Телефон: (499) 978-86-60

E-mail: rector@muctr.ru

Подпись Смушкевича Юрия Исаевича заверяю.
Ученый секретарь РХТУ им. Д.И.Менделеева
Доктор технических наук, профессор Т. В. Гусева



|  |