

ОТЗЫВ

Официального оппонента

на диссертацию Ямпольского Ильи Викторовича «Строение и механизмы функционирования новых субстратов биолюминесценции (люциферин) и хромофоров флуоресцентных белков», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия

Диссертационная работа И.В.Ямпольского направлена на исследование физико-химических механизмов излучения света (флуоресценция и биолюминесценция) биологическими объектами.

Феномен биолюминесценции описан для самых разных биологических объектов земли и моря (бактерии, светляки, морские беспозвоночные, кальмары, рыбы и др.), однако до настоящего времени нет четких механизмов преобразования химической энергии в световую на молекулярном уровне, функции свечения разных биологических объектов и эволюции биолюминесценции. В основе свечения заложено взаимодействие органических молекул, - люциферин, с ферментами - люциферазами. Необходимо отметить структурное разнообразие люциферин, также как и отсутствие филогенетического сходства люцифераз у изученных биолюминесцентных объектов. Это вносит существенные ограничения в фундаментальные исследования природы биолюминесценции в целом. Вместе с тем, наличие просто регистрируемого продукта ферментативной реакции, - световой эмиссии, - создает значимые преимущества биолюминесценции, как в научных исследованиях, так и в практическом применении фото-систем в биодетекции биологически активных веществ и контроле биопроцессов на молекулярном и клеточном уровне. Работа И.В.Ямпольского состоит из трех фундаментальных разделов: 1 - исследование структурных характеристик и процессов формирования хромофоров флуоресцентных белков, 2 - идентификация структуры, синтез и исследование механизма взаимодействия с люциферазой люциферина олигопептида *Fridericia heliota* и его аналогов, 3 – установление химического строения и процессов образования люциферина светящихся грибов.

Литературный обзор содержит современные данные о флуоресцентных белках, хромофорах, люциферинах и люциферазах бактерий, светляков, морских беспозвоночных. Описаны механизмы преобразования энергии в световую эмиссию биологическими структурами и объектами.

К основным достижениям работы следует в первую очередь отнести результаты по идентификации и синтезу новых люциферин червей и грибов, и изучению механизма взаимодействия этих соединений с люциферазами.

Установление структуры люциферина червей *Fridericia heliota* можно расценивать даже как открытие, поскольку к настоящему времени, несмотря на то, что в природе описаны свыше 700 люминесцирующих особей из 30 семейств, представлены структуры только 7 люциферин, в том числе люциферина биолюминесцентного червя *Diplocardia longa*.

Задача по анализу структуры природного люциферина решалась путем выделения и идентификации активного вещества и фрагментов, с последующим синтезом, и проверкой на билюминесцентную активность продукта в реакции с люциферазой. Решение, по идентификации близких, но неактивных в люциферазной реакции, пептидов, рассматриваемых в роли предшественников биосинтеза люциферина, логично и научно обосновано.

Совокупность экспериментов по анализу структурных фрагментов, позволила однозначно установить ранее не известную структуру люциферина червей *Fridericia heliota*. В результате анализа спектров ЯМР и масс-спектров установлены четыре фрагмента природного люциферина: CompX, Лизин, ГАМК, оксалат, из которых был синтезирован люциферин и ряд его не люминесцирующих аналогов. Принципиально совпадение спектров свечения *in vivo* со спектром эмиссии с синтетическим люциферинном *in vitro*.

Необходимо отметить важность результатов по идентификации продуктов билюминесцентной реакции, - оксилюциферина и CO_2 . Вывод о том, что оксилюциферин образуется путем окислительного декарбоксилирования остатка лизина, четко обоснован данными ЯМР анализа накопительной фракции продукта, после его экстракции и хроматографии ВЭЖХ. Крайне интересно заключение об идентичности механизма свечения червей с билюминесценцией светляков. Механизм существенно отличается от ранее известных схем свечения олигохет, в которых предусматривается обязательное участие перекиси водорода. В предложенной схеме генерации света *Fridericia heliota* предполагается формирование ряда люциферазных интермедиатов, включающих аденилат люциферина, пероксид-анион и диоксетанон, распад которого приводит к формированию возбужденного состояния оксилюциферина. Схема не противоречит представлениям о ключевых механизмах формирования эмиттера по диоксетаноновому пути.

Наряду с изучением структурных характеристик природного люциферина червей проведена работа по идентификации ряда сходных по структуре пептидов (2-12) с близкими к природному люциферину спектральными параметрами. Автором установлены структуры этих соединений и рассматривается их функциональная значимость в метаболизме червей. Автор корректно обсуждает возможные пути их образования и вовлечения в темновые и световые метаболические процессы.

Важные результаты получены при исследовании билюминесценции высших грибов. Химические основы билюминесценции грибов, несмотря на многочисленное описание феномена, остаются малоизученными. Большинство исследований ограничено эффектами холодных и горячих экстрактов мицелия грибов, преобразования энергии описывалось общей схемой, включающей NADPH- зависимое, катализируемое люциферазой, окисление люциферина кислородом с генерацией света. Основной причиной ограничений в исследовании люциферинных грибов является их низкое содержание и невысокая стабильность.

В представленной работе использован оригинальный подход, позволивший обойти эти ограничения. В основе экспериментального решения по идентификации люциферина грибов заложено предположение, что предшественники люциферина присутствуют и в

несветящихся видах, причем у определенных видов в значительно больших количествах, чем у светящихся. В то же время в работе нет четкого объяснения наблюдению, что вымачивание мицелия в воде резко повышает активность как горячих, так и холодных экстрактов. С использованием обращенно-фазовой хроматографии ВЭЖХ из плодовых тел несветящегося гриба *Pholiota squarrosa* выделены, идентифицированы и проверены на биоллюминесцентную активность шесть соединений - гиспидин и его производные. Предположение, что именно гиспидин является предшественником люциферина, получило прямое подтверждение выделением его из мицелия светящихся грибов *Neonothopanus nambi* и других видов, с последующим анализом люминесцентной активности. В качестве тест-системы успешно применен т.н. холодный экстракт из светящихся грибов *N. nambi*. Совпадение спектров биоллюминесценции смеси *in vitro* со спектром биоллюминесценции плодовых тел и спектром флуоресценции синтетического гиспида убедительно свидетельствовало, что предшественником люциферина грибов является гиспидин. Более того, в работе успешно проведена ферментативная конверсия гиспида в люциферин. Существенным достижением является трудоемкий синтез люциферина с биоллюминесцентной активностью, который однозначно подтвердил его структуру. Выдвинуто предположение, что в основе процесса образования люциферина заложена реакция NADPH-зависимого окислительного гидроксирования предлюциферинов (в частности гиспида), которая описана соответствующей схемой. Очевидно, что это предположение должно найти подтверждение в будущем, прежде всего выделением и исследованием биохимических характеристик изолированной оксигеназной ферментной системы, и возможным ингибиторным анализом. Необходимо отметить, что по предложенной схеме формирования люциферина окислительным путем, оксигеназная и люциферазная реакция фактически становятся конкурентными. Кроме того, в данной схеме остается неясной судьба продукта люциферазной реакции.

Ряд новых перспективных результатов получен автором в экспериментах по синтезу и исследованию переходов природных и синтетических GFP -подобных хромофоров. Схема научных подходов в этом направлении логична: установление структуры хромофора, синтез и изучение механизма переходов в свободном и связанном состоянии. Особое внимание уделено процессам переходов зеленого хромофора в красный продукт. Проведено детальное исследование процессов автоокисления, как пускового механизма спектральных переходов. Научно обосновано базовыми данными о влиянии pH микроокружения хромофора в активном центре флуоресцентных белков на его световую эмиссию. Детально изучено влияние аминокислотных заместителей и pH на спектральные характеристики хромофоров. С помощью мутагенеза получен флуоресцентный белок, хромофор которого содержит депротонированный остаток триптофана в хромофоре, что подтверждает возможность образования ионизованного индольного остатка триптофана в физиологических условиях. Результаты свидетельствуют, что протонированная и депротонированная формы триптофана могут определять спектральные характеристики флуорофора. Вывод, что основные аминокислотные остатки в микроокружении хромофора могут играть решающую роль в формировании красного пигмента, не противоречит имеющимся литературным данным. В работе представлена рабочая схема, описывающая процесс автоокисления зеленых (GFP) хромофоров в красные (DsRed) продукты. Схема подразумевает формирование нескольких интермедиатов в последовательных и параллельных реакциях. Вместе с тем

необходимо отметить, что использование в качестве параметра окислительной деградации хромофоров времени полураспада может дать только общую характеристику процесса, но недостаточно для строгой оценки стадий и интермедиатов. Очевидно, что полный кинетический анализ временной деградации зеленого хромофора и формировании красного продукта позволил бы дополнить предложенную схему окислительных переходов хромофоров. Очевидно, что процесс многостадийен, не протекает по кинетике реакции первого порядка и может быть более четко описан соответствующими константами для интермедиатов и конечных продуктов. Кроме того исследования временных характеристик автоокисления хромофоров проведены в жестких условиях (100°C, щелочная среда), что не может однозначно переноситься на биопроцессы, а лишь указывает на принципиальную возможность процесса. Результаты скорее свидетельствуют о высокой стабильности зеленого хромофора, что отмечено в работе.

Поставленные задачи решались с применением современных биохимических и физико-химических методов. По набору использованных подходов и их разнообразию экспериментальная часть работы свидетельствует о высоком уровне и широте методической подготовки автора. Необходимо отметить, что биохимические и кинетические исследования, процедуры выделения, идентификации и синтеза люцифериннов, несмотря на их трудоемкость, проведены тщательно и корректно. Принципиальных замечаний по постановке экспериментов и их интерпретации нет. Можно рекомендовать экспериментальную часть работы в качестве методического пособия.

Совокупность полученных в диссертационной работе И.В.Ямпольского результатов обоснованно свидетельствует о высоком теоретическом и экспериментальном уровне работы, а открытие структур люцифериннов червей и грибов является наиболее яркой иллюстрацией новизны работы и имеет фундаментальное значение.

Научно-практическая значимость представленных данных, прежде всего, определяются перспективностью применения открытых люцифериннов в создании новых биоаналитических систем для применения в биоинженерии, биомониторинге среды и технологических процессов.

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. Высказанные замечания скорее носят рекомендательный характер, и ни в коем случае не снижают значимость выполненных автором теоретических и экспериментальных исследований.

Приведенный в автореферате перечень статей, тезисов, также как участие в отечественных и зарубежных конференциях, свидетельствуют о высоком уровне научной работы диссертанта. Текст диссертации и автореферата изложен хорошим литературным языком, иллюстрации аккуратно оформлены. Представленные в автореферате сведения достоверны, выводы и рекомендации научно обоснованы.

Таким образом, диссертационная работа Ямпольского Ильи Викторовича является законченным, высококвалифицированным научным трудом, и удовлетворяет требованиям

«Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ (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.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник

кафедры микробиологии биологического факультета

Федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего

образования «Московский государственный

университет имени М.В.Ломоносова»

Исмаилов Анвар Джураевич

119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет.

Т. 8.495.9393450 р., 8.9169077758 моб.

E.mail : anvaris@list.ru

Подпись ведущего научного сотрудника

Доктора биологических наук А.Д.Исмаилова

заверяю

*ректор биологического ф-та
МГУ имени М.В. Ломоносова
академик*



С.П. Керножанов

hes