

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации К.А. Румянцева «Ближнеинфракрасные флуоресцентные и биолюминесцентные биомаркеры на основе бактериальных фитохромов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Биоимиджинг в настоящее время является очень популярной областью исследования. Под этим не очень удобоваримым термином понимается создание специальных маркерных молекул, которые могут быть использованы для отслеживания различных физиологически важных процессов в органах и тканях. Получено огромное количество разноцветных флуоресцентных белков и их химер, способных отслеживать изменение pH, концентрации ионов кальция, перекиси водорода, различных кофакторов в отдельных клетках и различных клеточных органеллах. Исследователи постепенно переходят от изучения изолированных клеток к изучению органов и тканей. Однако при использовании биоимиджинга для изучения органов и тканей возникает много новых проблем и одной из наиболее существенных проблем является плохая «прозрачность» исследуемых объектов. Оказалось, что окно прозрачности располагается в ближнеинфракрасной области в области спектра от 650 до 900 нм. Все это потребовало создания нового поколения флуоресцентных белков с особыми спектральными свойствами. В этой связи актуальность диссертационной работы К.А. Румянцева, посвященной получению и изучению свойств новых ближнеинфракрасных флуоресцентных белков не вызывает сомнения.

Диссертант начинает свое исследование с разработки получения мономерного ближнеинфракрасного флуоресцентного белка. В качестве исходного материала был использован бактериальный фитохром *Rhodospseudomonas palustris* RpBphP1, способный связывать биливердин. В ходе биоинженерных исследований К.А. Румянцев последовательно удалил эффекторный и PHY домены. Затем оказалось возможным удалить узел и RAS домены. Оставшийся GAF домен связывал биливердин, однако обладал пониженной устойчивостью. В ходе нескольких раундов направленного и случайного мутагенеза диссертанту удалось получить мономерный достаточно стабильный ближнеинфракрасный флуоресцентный белок, что, по моему мнению, является большим достижением.

Логичным продолжением исследования явилось подробное исследование свойств полученного флуоресцентного белка. Было установлено, что белок представляет собой мономер с кажущейся молекулярной массой порядка 20 кДа, что он способен связывать как биливердин, так и фикоцианобилин. Установлено, что в отличие от ранее описанных ближнеинфракрасных белков, новый флуоресцентный белок обладает высокой устойчивостью к фотообесцвечиванию и имеет два pH перехода при pH 4-5 и 7,8-8,3, что однако не мешает использовать его в экспериментах, проводимых в клетке. Предпринята попытка установить остаток, обеспечивающий закрепление биливердина или фикоцианобилина в белке. Точечная мутация C110S предотвращает связывание флуорофора, что расценивается как свидетельство того, что указанный остаток цистеина напрямую участвует в связывании флуорофора. Мне кажется, что для однозначного подтверждения этого положения потребуются проведение дополнительных исследований потому что точечная мутация может не только напрямую, но и опосредованно влиять на связывание биливердина или фикоцианобилина. Проведено исследование внутриклеточной локализации нового флуоресцентного белка и установлено, что он равномерно распределен в цитозоле исследуемых клеток.

Вторая часть диссертационной работы К.А. Румянцева посвящена разработке метода получения флуоресцентных и биолюминесцентных биомаркеров на основе бактериальных фитохромов. Для этой цели были сконструированы химерные белки, состоящие из мономерной люциферазы *Renilla reniformis* (RLuc8), соединенной линкерами разной природ и разной длины новых ближнеинфракрасным белком бактерий. Люцифераза катализирует окисление субстрата при окислении ProlumePurple II. В ходе этого процесса происходит высвечивание света с длиной волны около 400 нм, что достаточно для возбуждения тетрапиррольных флуорофоров, связанных с новым флуоресцентным белком. Таким образом, удастся собрать и сконструировать специальную систему, которая позволяет получить сигнал в ближнеинфракрасной области спектра. Разработанный оригинальный подход был использован для создания новых люминесцентных химер, состоящих из описанных ранее двухдоменных ближнеинфракрасных флуоресцентных белков iRFP670, iRFP720 и RLuc8. Были опробованы линкеры разной длины и разной природы и были подобраны условия для создания наиболее эффективных химер. Такие химеры были с успехом использованы для регистрации роста клеток опухолей, также для исследования процессов метастазирования.

Завершая анализ диссертационной работы К.А. Румянцева, можно заключить, что это исследование посвящено интересной и актуальной проблеме, выполнено на высоком методическом уровне и содержит оригинальные интересные результаты. О высоком качестве и оригинальности работы свидетельствуют публикации в высокорейтинговых научных журналах. Мне кажется, что анализ автореферата диссертации позволяет заключить, что рецензируемая работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842, а автор диссертации, Константин Алексеевич Румянцев, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Член-корреспондент РАН,
профессор кафедры биохимии
биологического факультета МГУ,
доктор биологических наук
по специальности 03.01.04 биохимия



Николай Борисович Гусев

Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва, 119234

Контактный телефон: 7-495-939-2747

E-mail: NBGusev@mail.ru

Биологический факультет Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ленинские Горы дом 1 корп. 12, Москва, 119234

Телефон: 8-495-939-27-76, Факс: 8-495-939-43-09

e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Почтовый адрес: Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва, 119234

