

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Румянцева Константина Алексеевича

«Ближнеинфракрасные флуоресцентные и биолюминесцентные биомаркеры на основе бактериальных фитохромов»,

представленную на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 03.01.03 - «молекулярная биология»

Диссертационная работа Румянцева Константина Алексеевича посвящена получению, оптимизации и исследованию новых флуоресцентных белков на основе бактериальных фитохромов (BphP). Выбранное направление является не только интересным с фундаментально научной точки зрения, но и чрезвычайно **актуальным**, в том числе в перспективе биомедицинских исследований. Особенно бурное развитие направления приходится на последние 3-5 лет, что находит свое отражение в количестве и уровне последних публикаций по данной тематике – это многочисленные статьи в журналах Scientific Reports, Nature Methods, Structure, PNAS из разных лабораторий мира. Несомненный горячий интерес в данной области означает высокий уровень конкуренции, в которой фактически выполнялась работа Константина Алексеевича, что заслуживает отдельного указания и увеличивает ценность оригинальных результатов, которые удалось получить и опубликовать.

В рамках направления исследований К.А. Румянцева многие исследовательские коллективы заняты поиском новых биомаркеров, которые позволяли бы проводить прижизненные исследования клеток глубоко в органах и тканях при помощи спектральных (флуоресцентных) методов, что изначально затруднено вследствие низкой прозрачности тканей из-за светорассеяния и значительного поглощения молекулами воды и многочисленных пигментов в клетках животных. В результате, для реализации такого подхода, который был бы незаменим для наблюдения за поведением меченых клеток в модельном организме, существует не так много теоретически доступных возможностей, наиболее важной из которых является использование так называемого «ближнеинфракрасного окна прозрачности» тканей (примерно 650-900 нм). При этом применение множества пигментов и флуорофоров в видимом диапазоне спектра, в том числе популярных флуоресцентных белков на основе GFP, оказывается низкоэффективным, поскольку спектры их флуоресценции и ее возбуждения не попадают в это окно (или попадает в них только спектр флуоресценции, как у некоторых красных производных GFP). В свете вышесказанного, современный прогресс в разработке новых биомаркеров опирается во многом на биоинженерную модификацию природных бактериальных фитохромов, основной хромофорной группой которых являются молекулы тетрапиррола биливердина, ковалентно связанные с белком. В то же время, природные бактериальные фитохромы обладают рядом характеристик, затрудняющих их использование в качестве перспективных биомаркеров даже несмотря на указанные преимущества. Из наиболее существенных таких особенностей, на устранение которых и направлено наибольшее количество усилий исследователей, стоит отметить (1) наличие у природных BphP сложной доменной структуры (домены PAS, GAF, «узел» и т.д.), а, следовательно, относительно большой молекулярной массы, и хромофорной группы, связанной за счет контактов

сразу с двумя доменами (PAS- GAF), (2) отсутствие высокого квантового выхода флуоресценции в ближнеинфракрасной области, что связывают с принципиально другим природным предназначением BphP – способностью к фотопереключению в ответ на поглощение разных квантов света (так называемые P_g и P_{fr} состояния), и, наконец, (3) склонность к образованию стабильных белковых димеров. Помимо ликвидации этих негативных особенностей BphP, усилия ученых также направлены на «разнесение» спектров флуоресценции производных BphP для одновременного использования нескольких из них при так называемом многопараметрическом (многоцветном) мечении, т.е. фактически для мониторинга нескольких одновременно протекающих процессов в рамках одного объекта исследований (животного или клетки) с высоким контрастом. Также перспективным подходом представляется использование в качестве фактора, возбуждающего флуоресценцию, не света, а низкомолекулярного соединения, и такую возможность предлагает использование различных ферментов люцифераз, которые способны при окислении своего специфического субстрата давать вспышки биолюминесценции.

Приятно отметить, что в рамках своей работы диссертант справился с решением практически всех этих сложных задач на одном или разных объектах исследований (однодоменный мономерный GAF-FP, двухдоменные iRFP670 и iRFP720 и их химеры с люциферазой Rluc8), что является значительным научным достижением.

Текст диссертации занимает 123 страницы и построен по общепринятой схеме: состоит из введения, трех частей (литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждения), заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы (183 ссылки) и приложения. Основной текст содержит 42 рисунка и 4 таблицы, приложение – 1 рисунок и 2 таблицы. Работа хорошо и красочно проиллюстрирована, основная часть рисунков находится в разделе «Результаты и обсуждение».

Литературный обзор хорошо написан и знакомит читателя со всей необходимой информацией, необходимой для понимания работы и ее значения. Дается общая характеристика бактериальных фитохромов, рассматривается их разнообразие и особенности применения для биомедицинских и других исследований как постоянно флуоресцирующих или фотоактивируемых биомаркеров, сенсоров белок-белковых взаимодействий. Разбираются детали биоинженерии генетически-кодируемых биомаркеров на основе BphP под нужды исследований по биоимиджингу, а также методические нюансы их использования и успешные примеры, известные из литературы.

Раздел «Материалы и методы» дает детальную информацию об использованных материалах, реагентах, клетках, экспериментальных объектах, приборных установках и методиках, а также параметрах, при которых проводились эксперименты. Указанная информация позволяет воспроизвести описанные эксперименты и служит ценным подспорьем для планирования новых.

Экспериментальная часть описана в разделе «Результаты и обсуждение», который интересно читать. Первый подраздел посвящен созданию и исследованию уникального однодоменного мономерного флуоресцентного биомаркера на основе бактериального фитохрома. Путем логичного чередования методов направленного и рандомного мутагенеза с сортировкой и анализом полученных промежуточных вариантов, фактически, с помощью ускоренной эволюции, получен новый

флуоресцентный ближнеинфракрасный биомаркер GAF-FP, который является мономерным и однодоменным. Данный значимый результат был бы невозможен без детального понимания автором структурной организации прототипного белка из пурпурной бактерии *Rhodopseudomonas palustris* RpBphP1, в том числе, нюансов его белок-хромофорных взаимодействий.

Полученный в итоге белок охарактеризован *in vitro* с помощью целого ряда биохимических и спектральных методов. Показана способность апоформы GAF-FP связывать *in vitro* как биливердин, так и другой тетрапиррол – фикоцианобилин, причем связывание второго происходит даже с большей эффективностью, то есть исходно связывающий исключительно биливердин белок теряет такую специфичность в результате мутагенеза. В данном контексте автор использует термин «сродство», хотя не рассматривает подробно механизм присоединения хромофора к молекуле BphP. Поскольку конечный аддукт является ковалентной модификацией белка по цистеиновому остатку, остается не совсем понятно, насколько применим термин «сродство».

Приведено красивое доказательство того, что в новом GAF-FP хромофор оказывается связанным с остатком цистеина в домене GAF, в положении 110, где у природного белка цистеин отсутствует. Именно этой новоприобретенной замене автор справедливо приписывает способность GAF-FP связывать хромофор в рамках одного домена. Это достижение позволило исключить PAS домен и значительно уменьшить размер FP до 20 кДа.

Нежелательная способность к димеризации у BphP является трудно устранимой и широко известной проблемой. Сам автор пишет об остаточной склонности к димеризации у некоторых BphP после введения мономеризующих мутаций в область интерфейса, особенно при повышении концентрации в растворе (стр. 23, последний абзац). После введения мономеризующих мутаций мономерное состояние GAF-FP было проверено методом гель-фильтрации, при этом образец белка в фиксированной концентрации наносили на колонку, откалиброванную с использованием белков с известной массой. Несмотря на то, что данный метод является корректным, на мой взгляд, было бы более информативно исследовать несколько концентраций наносимого белка, что позволило бы выявить возможные *тенденции* изменения олигомерного состояния и с большей уверенностью утверждать, что полученный белок является мономерным. Внутриклеточные условия характеризуются наличием так называемого макромолекулярного краудинга, при котором белки часто демонстрируют ассоциацию друг с другом, даже если этого не наблюдается в условиях разбавленного раствора *in vitro*. В этой связи существует опасность, что при более высоких концентрациях при оверэкспрессии, в условиях краудинга GAF-FP все же будет демонстрировать образование димеров. Более подробный гидродинамический анализ GAF-FP также позволил бы выявить склонность полученного искусственного белка к агрегации, что является нежелательным свойством для последующего использования такого белка в биоимиджинге, однако может быть закономерным следствием серьезного изменения аминокислотной последовательности. Исследования термостабильности вновь полученного однодоменного и мономерного белка GAF-FP классическими методами (например, дифференциальная сканирующая калориметрия), в дополнение к выполненному автором анализу влияния пептидных вставок в различные места структуры на стабильность FP, были бы также уместными и информативными.

Далее, автор оптимизирует и детально анализирует новые химерные конструкции GAF-FP с люциферазой Rluc8, обеспечивающей при окислении субстрата ProlumePurple биолюминесцентное свечение с максимумом в районе 400 нм, что хорошо перекрывается со спектром поглощения GAF-FP и обеспечивает внутримолекулярный перенос с испусканием квантов флуоресценции в ближнеинфракрасном окне. При систематическом изменении взаимного положения Rluc8 и FP и длины линкера между ними автором найден вариант, обладающий наиболее яркой флуоресценцией в ближнеинфракрасной области и хорошим контрастом, достигаемым главным образом за счет использования химического источника возбуждения флуоресценции (целентеразин-подобного субстрата люциферазы), и, как следствие, возможности проводить биоимиджинг при чрезвычайно низком уровне фона (автофлуоресценции). Такая химерная конструкция была проверена автором при использовании мышинного «фантома», имитирующего прозрачность тканей животного и обеспечила высокий контраст при съемке даже на глубине до 18 мм под поверхностью. Создание такой химерной люциферазы является безоговорочным достижением автора, а использованный принцип может в дальнейшем успешно применяться при создании других подобных химер, что и продемонстрировал Константин Алексеевич.

При исследовании химерных люцифераз, содержащих в качестве ближнеинфракрасного FP двухдоменные, разработанные ранее iRFP670 и iRFP720, автором был применен подход, отработанный на более простом GAF-FP, благодаря чему была оптимизирована длина линкера и положение слитых белков, способствующие наиболее выгодным параметрам переноса энергии биолюминесценции при окислении целентеразин-зависимого субстрата, химическая природа которого также была оптимизирована (испробованы соединения ProlumePurple I-IV, среди которых наиболее перспективным оказался I тип). Была показана практическая возможность разделения каналов флуоресценции iRFP670 и iRFP720 как при возбуждении флуоресценции, так и при биолюминесценции с использованием BRET с люциферазного компонента химеры. Более того, убедительно продемонстрировано, что параметры флуоресценции и биолюминесценции полученных химерных люцифераз при должном калибровании уровней сигналов могут быть использованы для количественной оценки клеток, стабильно экспрессирующих ту или иную люциферазу, и введенных в лабораторное животное. Оказалось, что биолюминесцентный вариант съемки дает на порядок большую чувствительность, чем флуоресцентный, и позволяет регистрировать до $1-3 \cdot 10^4$ клеток в зависимости от типа iRFP, а также подходит для продолжительных наблюдений (сутки, недели) за развитием человеческих раковых клеток, меченных люциферазами, при их введении в лабораторных животных. Учитывая низкие пороговые значения обнаружения клеток даже глубоко в тканях животного, автором показана также возможность изучения вторичных опухолей в легких животных, при преимуществах двухцветного мечения и разделения сигнала биолюминесценции по каналам.

Большая часть изложенных результатов, полученных К.А. Румянцевым в ходе выполнения его диссертационного исследования, являются оригинальными и опубликованы в виде 10 печатных работ в отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях (4 статьи и 6 тезисов). Стоит отметить, что две из них опубликованы в престижном журнале Scientific Reports (группа Nature), что ставит исследование

Константина Алексеевича на высокий международный уровень. Опубликованные работы отражают основные результаты, являющиеся предметом защиты.

Диссертация написана строгим научным языком, изложение логично и последовательно, но текст содержит *большое* число опечаток, грамматических ошибок, незаконченных фраз, пропущенных слов и неудачных выражений, суммарное число которых доходит до трех на страницу текста, что негативно сказывается на восприятии работы. При этом текст автореферата подобных ошибок и неточностей практически не содержит.

Замечания и вопросы:

1. стр. 19, таблица 1 – «фитохоромов», «гоммодимеризующийся», стр. 23, «компоненты после комплетемнции», стр. 25, «*значительный* интерес представляет *незначительное* смещение спектров»; очевидно, допущена опечатка в номере мутации Val86Met, вызывающей смещение спектров флуоресценции FP на 10 нм (должно быть Val186Met), что может дезинформировать заинтересованных специалистов, стр. 33, «для обнаружения **вплоть не** менее $5 \cdot 10^4$ клеток», стр. 36. «Используя iRFP670 и iRFP720, микроскопия предоставила возможность...», стр. 41. «Направленный и сайт-специфический мутагенез» (это одно и то же) и т.д.

2. Подпись рис. 15 на стр. 39. «Реакция биолюминесценции люцифераз **светлячка** (А) *Renilla reniformis* (RLuc) и (Б) *Photinus pyralis* (FLuc)» содержит лишнее слово «светлячка», поскольку из них только *Photinus* является светлячком.

3. Почему рис. 6 (стр. 26) введения является черно-белым? На данном рисунке рассматривается преимущество использования **цветных** белков при имиджинге клеток первичных нейронов и приводится **черно-белый** рисунок.

4. ссылка табл. А.1 и рис. Б.1. – нет первого указания, что имеется в виду отсылка читателя к *приложению*, поэтому сложно сразу найти, на какую именно инфографику ссылается автор в тексте литературного обзора. Само приложение, в особенности, рис. Б.1 призван дать полезную конкретную информацию о различных мутантах и вариантах FP, однако рисунком не очень удобно пользоваться, поскольку информация недостаточно хорошо систематизирована и пояснена, например, в легенде к рисунку. Кроме того, в тексте идет отсылка просто к рис. Б1, однако ввиду того что он очень объемный, более точное указание было бы более полезным.

5. В исследовании экспрессии GAF-FP в клетках животных был использован его «белок слияния» с sfGFP. Во-первых, непонятно, почему в одной части работы использован термин «белок слияния», а в другой – «химерный белок»? Во-вторых, возникает вопрос, какова масса полученного «белка слияния» и как довольно большой белок мог проникать в ядро, как это следует из рис. 29.

Тем не менее, наличие замечаний, сделанных по диссертации, не влияет на общую положительную оценку работы и не ставит под сомнение полученные результаты. Диссертационная работа содержит достаточный по объему оригинальный экспериментальный материал, результаты обсуждаются с учетом современных представлений и понятий, а предложенные выводы следуют из полученных результатов и являются убедительными. Диссертация К.А. Румянцева представляет собой законченное исследование актуальных и практически важных научных задач.

Автореферат адекватно отражает содержание диссертации и может быть рекомендован для использования широким кругом исследователей.

В целом, диссертационная работа соответствует всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением №842 Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Румянцев Константин Алексеевич, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

старший научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка
Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук
Москва 119071, Ленинский пр-т 33, к. 1.
Тел.: 84959521384,
e-mail: nikolai.sluchanko@mail.ru
кандидат биологических наук,

23 мая 2017 года

Николай Николаевич Случанко

