



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

Утверждаю

ВРИО зам. директора Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Института биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова
Российской академии наук, д.х.н.



И.В. Ямпольский

"15" мая 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертационной работы
Румянцева Константина Алексеевича
на тему «**Ближнеинфракрасные флуоресцентные и биолюминесцентные
биомаркеры на основе бактериальных фитохромов**»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа К.А. Румянцева посвящена развитию технологий флуоресцентного и биолюминесцентного мечения живых систем с помощью мутантных вариантов бактериальных фитохромов.

Генетически кодируемые флуоресцентные и биолюминесцентные метки широко используются в современных фундаментальных работах на модельных биологических системах, а также в биомедицинских исследованиях, направленных на расшифровку механизмов заболеваний и созданию новых лекарственных средств. В отличие от химических красителей, такие метки позволяют проводить неинвазивную визуализацию в живых системах с чрезвычайно высокой специфичностью.

Особую нишу в данном инструментарии занимают ближнеинфракрасные флуоресцентные белки на основе бактериальных фитохромов. Основным их преимуществом является их длинноволновая флуоресценция, попадающая в так

называемое «окно прозрачности» тканей млекопитающих (приблизительно от 650 нм до 900 нм). Из-за низкого рассеяния и поглощения света тканями в этом спектральном районе, сигнал ближнеинфракрасных флуоресцентных белков может быть надежно детектирован даже на глубине сантиметра и более. Таким образом, данные метки открывают широкие перспективы по изучению нормальных и патологических процессов *in vivo* в модельных животных.

Технология ближнеинфракрасных флуоресцентных белков, впервые предложенная в 2009 году, в настоящее время находится на стадии бурного развития. Лаборатории во всем мире работают над получением улучшенных вариантов таких белков и методов их использования для флуоресцентного, биолюминесцентного и оптоакустического имиджинга *in vivo*. Данная диссертационная работа вносит существенный вклад в прогресс данной области исследований.

Диссертация К.А. Румянцева построена по общепринятому плану и включает в себя следующие основные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Материал диссертации изложен на 123 страницах, хорошо иллюстрирован (42 рисунка и 4 таблицы плюс рисунок и 2 таблицы в приложении), список литературы включает 183 источника. Во введении убедительно описано значение и актуальность проблематики, сформулированы цели и задачи работы, представлена научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

В литературном обзоре подробно рассматриваются доступные на сегодняшний день публикации в области разработки и использования ближнеинфракрасных флуоресцентных белков на основе бактериальных фитохромов. Описывается структура и биохимия бактериальных фитохромов, а также методические подходы к направленному изменению их спектральных свойств с целью получения практически значимых флуоресцентных маркеров. Автор описывает основные классы меток на основе бактериальных фитохромов – постоянно флуоресцирующие белки, фотоактивируемые флуоресцентные белки, и сплит-варианты для детекции белок-белковых взаимодействий. Далее, рассматриваются методы применения ближнеинфракрасных флуоресцентных белков для визуализации целевых клеточных популяций и белков, изучения белок-белковых взаимодействий, а также детекции фаз клеточного цикла, активации каспаз в ходе апоптоза и запуска некоторых других сигнальных каскадов.

Отдельное внимание уделено методам прижизненной визуализации процессов

глубоко в тканях – флуоресцентной томографии и фотоакустической томографии, которые позволяют реконструировать трехмерные изображения. Описано применение имиджинга времени жизни флуоресценции и фотопереключения для отделения целевого сигнала от фона и, следовательно, увеличения чувствительности детекции.

Наконец, автор кратко описывает принципы и метода применения биолюминесценции для имиджинга *in vivo* с акцентом на люциферазы с эмиссией в красной и дальнекрасной областях спектра.

Важно отметить, что автор дает не просто описание, а критически рассматривает достоинства и недостатки той или иной системы мечения. В целом, обзор написан хорошим языком, прекрасно иллюстрирован (16 рисунков) и содержит ссылки на самые современные работы.

Раздел «Материалы и методы» содержит описание использованных приборов и реагентов, а также подробные протоколы методов. Раздел, занимающий 18 страниц, написан чрезвычайно обстоятельно и содержит всю необходимую информацию для воспроизведения экспериментов. Следует особо отметить, что в работе был использован чрезвычайно широкий спектр методов – геновая инженерия, выделение рекомбинантных белков, оптическая спектроскопия, культивирование и трансфекция клеток млекопитающих (в том числе, создание стабильных клеточных линий), флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток, флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг мышинных моделей *in vivo* и *ex vivo*.

Описание результатов экспериментальной работы, выполненной автором, содержится в разделе «Результаты и их обсуждение». Целью данной работы было получение новых ближнеинфракрасных флуоресцентных и комбинированных (флуоресцентных и биолюминесцентных) генетически кодируемых меток на основе бактериальных фитохромов. Работа включает в себя несколько частей, описанных ниже.

Была проведена обширная работа по направленной молекулярной эволюции бактериального фитохрома RpBphP1 из *Rhodospseudomonas palustris*, который ранее не использовался для получения ближнеинфракрасных флуоресцентных белков. С использованием направленного (на основании информации по другим белкам этого семейства) и случайного мутагенеза были получены флуоресцентные варианты этого белка. Далее был проведен делеционный мутагенез, позволивший впервые получить флуоресцентный белок из одного GAF-домена (известные до этого ближнеинфракрасные флуоресцентные белки содержали PAS и GAF домены и включали в себя необычную структуру «узла» полипептидной цепи). Таким образом, с помощью элегантно

спланированного направленного дизайна удалось получить мономерный ближнеинфракрасный флуоресцентный белок GAF-FP, характеризующейся наименьшим среди белков этого класса размером.

Подробное изучение спектральных, физико-химических и биохимических свойств GAF-FP показало, что этот белок способен ковалентно связывать как биливердин, так и фикоцианобилин в качестве флуоресцентного кофактора; были охарактеризованы основные свойства этого белка: квантовый выход флуоресценции и молярный коэффициент экстинкции и скорость созревания, pH-стабильность и др. Оказалось, что GAF-FP является мономерным белком, что потенциально позволяет использовать его для мечения целевых белков. GAF-FP характеризуется высокой фотостабильностью, что также является важным преимуществом в ряде моделей. К сожалению, экспрессия GAF-FP в клетках млекопитающих показала, что для достижения им максимальной яркости необходимо добавление в среду биливердина.

Автор провел изучение устойчивости GAF-FP к пептидным вставкам в различные (случайно выбранные) места последовательности этого белка. В результате было найдено 4 положения, в которых вставка 5-аминокислотной последовательности не мешала проявлению флуоресцентных свойств GAF-FP. Эта работа закладывает фундамент для дальнейшей разработки флуоресцентных сенсоров на основе GAF-FP с помощью инсерций целевых белковых последовательностей или создания круговых пермутантов по найденным положениям.

Большой объем экспериментальной работы был проведен автором для создания и изучения свойств химерных белков, включающих в свой состав люциферазу и ближнеинфракрасный флуоресцентный белок. Целью этой части диссертации было создание люциферазы с эмиссией в ближнеинфракрасной области спектра. После создания и тестирования панели химерных белков с различным взаимным расположением и линкерами между люциферазой RLuc8 и ближнеинфракрасным флуоресцентным белком (GAF-FP, iRFP670 или iRFP720), были отобраны оптимальные конструкции. Таким образом, был впервые продемонстрирован резонансный перенос энергии между RLuc8 и ближнеинфракрасными флуоресцентными белками, приводящей к появлению ближнеинфракрасной биолюминесценции. При этом химерная люцифераза iRFP720—RLuc8 имеет наиболее длинноволновый максимум биолюминесценции среди известных генетически кодируемых маркеров. Важным методическим приемом, обеспечившим успех данной части работы, было использование целентеразин-подобных субстратов семейства Prolume Purple (PPI, PPII, PPIII и PPIV). Эти субстраты обеспечивают люминесценцию

RLuc8 с максимумом около 400 нм и хорошим спектральным перекрытием с коротковолновой полосой поглощения хромофора ближнеинфракрасных флуоресцентных белков.

Полученные химерные маркеры были тестированы на моделях привитых опухолей мышей. Была продемонстрирована четко детектируемая ближнеинфракрасная люминесценция опухолей и метастазов, полученных их клеток, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8. Более того, благодаря 50-нм разнице в максимуме эмиссии данных белков, был осуществлен двухцветный биолюминесцентный имиджинг на мышинных моделях. Важно отметить, что гибридная природа полученных маркеров позволяет проводить как люминесцентный, так и флуоресцентный имиджинг одних и тех же биологических моделей.

В целом, работа К.А. Румянцева имеет высокую научную значимость, проясняя многие аспекты биохимии и структурно-функциональных взаимосвязей в белках семейства бактериофитохромов. Вместе с тем, данная работа имеет и ярко выраженную практическую направленность в области развития методов молекулярной и клеточной биологии, высоко востребованных в научных учреждениях как в России, так и за рубежом.

Новые флуоресцентные и биолюминесцентные маркеры GAF-FP, iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8, полученные в работе К.А. Румянцева, могут быть использованы в лабораториях, использующих в своих исследованиях многопараметрическую флуоресцентную микроскопию или биоимиджинг моделей животных *in vivo* (ИБХ РАН, ИБГ РАН, ИБР РАН, ИНБИ РАН, МГУ, СПбПУ, ННГУ). Разработанные ближнеинфракрасные маркеры имеют большое преимущество при визуализации животных моделей опухолеобразования и метастазирования, что делает их востребованными в медицинских учреждениях, специализирующихся на изучении механизмов опухолеобразования и разработке новых антиопухолевых препаратов (РОНЦ, РНИМУ, НижГМА).

Принципиальных замечаний по работе нет. Ниже приведен список замеченных недостатков данной работы и вопросов к автору:

- В экспериментах по биолюминесцентному имиджингу на мышинных моделях с использованием химерных маркеров GAF-FP—RLuc8, iRFP670—RLuc8 и/или iRFP720—RLuc8 (разделы 3.2.2, 3.2.6, 3.2.8 и 3.2.9) хотелось бы видеть

сравнение интенсивностей люминесцентного сигнала при детекции в синем канале на максимуме эмиссии люциферазы и в ближнеинфракрасном канале детекции.

- Стр. 11 (обзор литературы): «В видимом и инфракрасном диапазонах света значения коэффициента светорассеяния, лежащие в пределах от 5 до 30 см^{-1} , существенно превышают усредненные значения коэффициента поглощения, лежащие в диапазоне от 0.02 до 2 $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [18]». «В то же время в так называемом ближнеинфракрасном окне прозрачности биологических тканей от 650 до 900 нм поглощение света в большинстве случаев остается достаточно низким (менее 0.2 $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) ...». Поглощение света тканями обычно характеризуется коэффициентом поглощения, выраженном в см^{-1} , а не в $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.
- Стр. 12 (обзор литературы): «Это определяет возможность использования BphP и белков на их основе в качестве биомаркеров для биомедицинских исследований без экспрессии гемоксигеназы или введения экзогенного хромофора для биомедицинских исследований» - ненужный повтор «для биомедицинских исследований».
- Рис. 15Б (стр. 39): не обозначено участие кислорода в реакции биолюминесценции FLuc.
- Подпись к Рис. 8: «... вместе с мРНК, меченной ECFP ...». Следовало написать «... вместе с мРНК, кодирующей ECFP ...».
- Вместо термина «конструкт», часто используемого в диссертации, лучше писать «конструкция».

Впрочем, названные недочеты не умаляют основных достоинств данной работы. Полученные результаты отражают высокий методический и профессиональный уровень работы, а также тщательность и аккуратность при анализе экспериментальных данных. Выводы, сделанные автором, базируются на полученных результатах, убедительны и не вызывают сомнений. Автореферат диссертации полностью отражает содержание работы. Основные материалы диссертации опубликованы в международных (2 статьи в Scientific Reports – журнале группы Nature) и российских (статья в журнале Цитология и обзор в журнале Вестник РГМУ) научных журналах. Разные части работы были представлены на международных и российских конференциях и опубликованы в 6-ти тезисах докладов.

Заключение

Диссертационная работа К.А. Румянцева «Ближнеинфракрасные флуоресцентные и биолюминесцентные биомаркеры на основе бактериальных фитохромов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, является законченным исследованием, которое дает новое решение актуальной научной задачи по разработке подходов к флуоресцентной и биолюминесцентной визуализации структур и процессов в живых системах.

По актуальности, научной и практической значимости, объему экспериментальной работы и теоретического анализа, новизне полученных результатов и сопоставлению их с литературными данными настоящая диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Румянцев Константин Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Отзыв обсужден и утвержден на заседании совместного семинара лаборатории биофотоники, лаборатории молекулярных технологий, лаборатории рентгеноструктурного анализа, группы синтеза природных соединений ИБХ РАН 12 мая 2017 года, протокол № 5.

Зав. лабораторией биофотоники ИБХ РАН,
д.б.н., член-корр. РАН



К.А. Лукьянов

Отзыв заверен

Ученый секретарь ИБХ РАН



В.А. Олейников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)
ул. Миклухо-Маклая 16/10
117997 Москва
Тел: (495) 335-01-00
E-mail: office@ibch.ru
www.ibch.ru