

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук Мяснянко Ивана Николаевича на тему: «Производные хромофоров флуоресцентных белков как флуорогены красители для белка FAST» по специальности 1.4.9 – «биоорганическая химия».

Диссертационная работа И.Н. Мяснянко находится в русле чрезвычайно важной темы – визуализации процессов, происходящих в живых системах. Трудно переоценить значимость данной проблемы, касающейся разнообразных аспектов биологии, медицины и смежных дисциплин. В связи с тем, что большинство изучаемых объектов бесцветны, одним из распространенных методов визуализации является введение флуоресцентных меток, наблюдаемых с помощью флуоресцентной микроскопии, соответственно, разработка удобных для этих целей флуорофоров представляет собой важную задачу. Одним из перспективных подходов является использование флуороген-активирующих белков, которые сами по себе бесцветны, но могут образовывать комплексы с флуорогенами – веществами, которые также сами по себе обладают малоинтенсивной флуоресценцией, но интенсивность которой возрастает многократно при связывании с целевым белком. Белок под названием FAST в настоящее время активно исследуется в таком качестве в связи с более высокой эффективностью флуоресценции по сравнению с классическими флуоресцентными белками, и наиболее важной является разработка флуорогенов, способных обеспечивать флуоресценцию в длинноволновой области спектра, где поглощение света биологическими объектами минимально. Автором выбраны в качестве перспективных кандидатов на роль флуорогенов соединения ряда арилиденимидазолонов, которые не были ранее изучены в таком качестве. По замыслу автора, варьирование заместителей в составе данных молекул позволило бы изменять в широких пределах максимумы поглощения и эмиссии, а внутренняя или внешняя фиксация молекулы могла бы привести к значительному росту квантового выхода флуоресценции. Таким образом, из вышесказанного вытекает несомненная **актуальность** и **научная новизна** данного диссертационного исследования.

Для достижения поставленной цели – создания новых флуорогенов для белка FAST на основе производных хромофоров флуоресцентных белков – И.Н. Мяснянко сформулировал ряд взаимосвязанных задач, предполагающих общий план исследования в виде рекуррентной последовательности синтеза флуорогенов, исследования их связывания с белком и изучения флуоресцентных свойств образующихся комплексов, с выявлением закономерностей на каждом этапе работы с конечной целью определения возможности применения лучших флуорогенов в качестве флуоресцентных меток в

живых системах. Логика работы с этой точки зрения совершенно ясна и не вызывает вопросов. Диссертационная работа изложена на 156 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 249 ссылки. Диссертация содержит 9 рисунков, 67 схем и 10 таблиц.

Обзор литературы посвящен, во-первых, проблеме выбора хромофорных меток и введению их в состав белков для визуализации последних. Рассмотрены следующие основные разновидности таких меток: 1) пептидные метки, которые в наименьшей степени могут повлиять на функциональность интересующего белка; 2) флуоресцентные белки, способные самостоятельно в определенных условиях формировать хромофор из собственных аминокислот; 3) самомодифицирующиеся белки, не обладающие собственными хромофорными или флуорофорными группами, но которые могут ковалентно связываться с низкомолекулярным субстратом, в свою очередь, связанный с оптической меткой. В данной части Обзора литературы подчеркивается возможность как ковалентного связывания белка с меткой, так и образования устойчивых молекулярных комплексов, также пригодных для целей визуализации. Другая часть обзора затрагивает хромофоры флуоресцентных белков, представляющих собой 4-бензилиден-1H-имидазол-5(4H)-оны, и основной акцент автором сделан на методах синтеза такого рода соединений (всего рассмотрено 7 синтетических подходов), а также на их модификации с целью введения интересующих заместителей, важных для модулирования спектральных свойств и образования ковалентных связей с белками. Автором систематизированы также методы модификации и выделены реакции конденсации и окисления. Всего в обзоре литературы рассмотрен 231 литературный источник, в подавляющем большинстве это новые работы, среди которых немало опубликованных в последние два-три года. Это дополнительно свидетельствует в пользу значимости и актуальности предпринятого исследования.

Основные достижения автора рассмотрены в главе **Обсуждение результатов**. Их можно разделить на достижения в области синтеза и успехи в области применения синтезированных соединений для визуализации белков. Рассмотрим область органического синтеза. И.Н. Мяснянко для получения широкой гаммы бензилиденимидазолонов предложил улучшить популярный подход к синтезу такого рода соединений (имеются в виду реакции циклоприсоединения оснований Шиффа к иминоэфирам) для расширения круга заместителей в целевых продуктах. В качестве альтернативного способа получения промежуточных иминоэфиров им использована реакция *O*-алкилирования амидоацетатов с помощью тетрафторбората триэтилоксония. Это позволило на первом этапе получить серию производных 4-(4-гидроксибензилиден)-

1*H*-имидазол-5(4*H*)-она, содержащих различные заместители в положении 2 гетероцикла. Автором продемонстрирована возможность введения заместителей к атому азота, варьирование природы арилиденового заместителя в положении 4 гетероцикла, а также окисление бензильного заместителя с образованием гетероциклических кетонов для смещения максимума поглощения соединений в длинноволновую область.

На следующем этапе И.Н. Мяснянко осуществил синтез интересных бициклических гетероциклов – производных имидазолонов, представляющих собой циклические имиды. Им были выбраны соединения с максимальной длиной волны максимума поглощения, что оказалось возможным благодаря варьированию природы заместителей в арилиденовом фрагменте. В дополнение к уже синтезированным соединениям для выявления перспективных кандидатов на роль флуорогенов белка FAST были протестированы разные производные хромофоров флуоресцентных белков, содержащие гидроксигруппы в четвертом положении бензилиденового заместителя и стирильные (4-пиридилэтильные) заместители в положении 2 гетероцикла, при этом также проведено широкое варьирование заместителей в данных фрагментах.

После изучения спектральных свойств некоторых соединений в воде при различных рН было изучено связывание ряда флуорогенов с белком FAST, рассчитаны константы диссоциации молекулярных комплексов и показано, что происходит ожидаемое разгорание флуоресценции от 10 до 200 раз в зависимости от природы заместителей во флуорогене. Исследования синтезированных соединений по способности проникать в клетки показали, что в наибольшей степени флуоресценция в ядре клетки, равно как и отсутствие неспецифичного окрашивания характерны для (*Z*)-4-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-1-метил-2-((*E*)-2-(пиридин-4-ил)винил)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она.

Исследование оптических свойств показало, что спектральные характеристики комплекса данного соединения с белком FAST схожи со свойствами комплекса, образующегося с описанным в литературе флуорогеном HBR-DOM, положение максимумов поглощения и эмиссии этих комплексов практически совпадают, однако, спектр флуоресценции указанной пары имеет заметно более широкую форму, что позволит детектировать флуоресцентный сигнал в большем диапазоне (до 700 нм), а незначительная фоновая флуоресценция несвязанного флуорогена будет обеспечивать хорошую контрастность флуоресцентного сигнала метки. Интересно было бы узнать, известен ли к настоящему времени механизм связывания изученных ранее и изучаемых в настоящей работе флуорогенов с белком FAST.

Получив обнадеживающие практические результаты, И.Н. Мяснянко продвинулся далее в своих исследованиях и получил обширный ряд аналогов вышеуказанного соединения, которые также содержали 4-гидрокси-2-метоксибензилиденовый

заместитель. Введение электронодонорных и акцепторных групп позволило получить комплексы с белком FAST, обладающих флуоресценцией в диапазоне 550-650 нм, при этом в наибольшей степени смещение в красную область удалось получить при увеличении системы сопряженных двойных связей (в том числе, в бициклических производных) и при введении в пиридиновое кольцо галогенов. Полученные на данном этапе работы флуорогены были протестированы в окрашивании живых клеток HeLa, трансфицированных конструкцией H2B-TagBFP2-FAST, причем разница в максимумах спектров эмиссии при использовании разных флуорогенов позволяет отслеживать меченые объекты с использованием разных флуоресцентных фильтров. Поскольку данная часть работы выполнена автором при активном участии сотрудников лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН, очевидно, подробности биологических экспериментов не были включены в Обсуждение результатов. В заключение автором сделан вполне обоснованный вывод о том, что бензилиденимидазолы являются отличной основой для создания флуорогенов белка FAST различной окраски.

Экспериментальная часть содержит описание методик получения соединений, их спектральные данные и оформлена очень тщательно, что подтверждает экспериментальные навыки диссертанта и достоверность полученных результатов. Интересно, что самое первое соединение, метил 2-пропионамидоацетат (**1a**) до сих пор не было описано в литературе; в настоящее время редко когда синтетик может получить новое вещество с молекулярной массой 146. **Выводы** в целом точно и верно отражают основные достижения работы, а **Список литературы**, содержащий 249 наименования, аккуратно и тщательно оформлен.

Основное содержание диссертационного исследования отражено в 4 статьях, опубликованных в журналах из перечня научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертационных работ, и доложены на 2 национальных научных конференциях. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

В результате проведенного анализа текста диссертации, автореферата и публикаций И.Н. Мяснянко можно ответственно заявить, что цель работы, сформулированная в постановочной части, автором достигнута, а сопутствующие ей задачи выполнены. Представленные в работе научные положения, выводы и рекомендации являются обоснованными.

Работа не вызывает каких-либо серьезных замечаний, однако некоторые вопросы следует обсудить.

- 1) На схемах в Обзоре литературы не указаны выходы соединений, что затрудняет анализ данных и препятствует сравнению с данными, полученными автором диссертации.
- 2) В Обсуждении результатов автором не проводится анализ различия в выходах целевых соединений, разброс которых зачастую весьма велик. Для читателя было бы интересно и познавательно узнать, чем обусловлено такое различие, тем более, что это является хорошо знакомой проблемой для каждого химика-органика.
- 3) В работе есть ряд терминов, которые не получили должной расшифровки и не совсем понятны читателю, не являющемуся специалистом в области флуоресцентной визуализации белков, а без пояснений они могут быть неправильно истолкованы. Например, выражение «генетически кодируемые метки», даже в пояснительной фразе «Новым типом генетически кодируемых флуоресцентных меток стали так называемые флуороген-активирующие белки» этот термин никак не проясняется. Таким же неясным термином является «хромофоры флуоресцентных белков». К этому же стоит добавить и термин «константа диссоциации», который используется для характеристики образующихся молекулярных комплексов флуорогенов с белком FAST. Является ли обратная ей величина обычной константой устойчивости? Почему автор оперирует именно такой величиной?
- 4) В Экспериментальной части можно было привести данные спектров поглощения, тем более, что очень значительная часть соединений была ими охарактеризована, как следует из Обсуждения результатов.
- 5) Выводы 3, 4 и 5 можно было сформулировать более содержательно, избегая таких неопределенностей, как «некоторые производные», «группа веществ», «направления для структурной модификации».

Вышеперечисленные незначительные замечания ни в коей мере не уменьшают значимость проведенной работы, не влияют на содержание выводов, сделанных на основании полученных соискателем данных, не ставят под сомнение новизну и практическую значимость полученных результатов.

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертация «Производные хромофоров флуоресцентных белков как флуорогенные красители для белка FAST» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая по актуальности выбранной темы, уровню проведенных исследований, научной и практической значимости, степени обоснованности научных положений и выводов полностью соответствует всем требованиям, установленным пунктами 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650;

20.03.2021 г. № 426), а ее автор, Мяснянко Иван Николаевич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия,
ведущий научный сотрудник кафедры органической химии
Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
Аверин Алексей Дмитриевич

Подпись Аверина А.Д. удостоверяю:

Декан Химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова,
член-корреспондент РАН, профессор
Калмыков Степан Николаевич



Почтовый адрес: 119991, Российская Федерация,

г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3

Наименование организации:

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
Химический факультет

Телефон: +7-495-939-3571

Адрес электронной почты: averin@org.chem.msu.ru

17 сентября 2021 г.