

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-1Н-имидазол-5(4Н)-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)-

