

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации СМИРНОВОЙ Дарьи Васильевны

"Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и их биоаналитическое применение", представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - биохимия, 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнология).

С развитием науки все большее значение приобретают методы определения микроколичеств биологически активных соединений, с использованием флуоресцентных или биолюминисцентных инструментов. Эти методы имеют не менее высокую чувствительность, чем широко распространенные ранее радиоизотопные методы, но в отличие от последних имеют дело с безвредными и безопасными соединениями, что дает им преимущество перед радиоактивными изотопами. Давно уже целый ряд общепринятых методик, как то сиквенирование, иммунные методы и т.д., используют в качестве инструментов флуоресцирующие соединения либо биолюминисцентные детекторы. В сочетании с возможным получением высокоспецифичных конъюгатов нужной направленности, эти методы на сегодняшний день являются последним словом биологической науки.

Диссертационная работа Д.В.Смирновой посвящена разработке методологии определения микроколичеств целевых соединений с использованием конъюгатов, несущих с одной стороны белок-детектор, и с другой - компонент, способный высокоэффективно связываться с необходимой мишенью. В данной работе были получены, в частности, гибридные белки на основе люциферазы светляков, в качестве высокоспецифичных компонентов несущих биотин- или стрептавидин связывающие домены.

Что касается первых - такие продукты, как указывает автор, известны, но все находятся под защитой патентов, что привело автора к необходимости собственной разработки и получения подобных конъюгатов. Относительно стрептавидиновых конъюгатов данные отсутствуют. Хотелось бы более четкой формулировки, указывающей, что подобные конструкции разработаны автором впервые.

Весьма интересным явлением оказалась зависимость олигомерного состава полученных химер, а также люциферазной активности и сродства к биотину от последовательности доменов в конструкторе. К сожалению, автореферат диссертации - это не тот объем, который позволил бы обсудить причины этого явления с помощью молекулярных моделей, но возможно в диссертации такое обсуждение есть.

Были получены такие же конъюгаты на основе мутантной формы люциферазы (две замены), которая помимо своей термостабильности еще и демонстрирует сдвиг максимума в спектре биолюминесценции, что позволяет в ряде случаев (в зависимости от используемого красителя) уменьшить фоновый сигнал почти в 4 раза, то есть увеличить чистоту и чувствительность получаемых результатов.

Всесторонняя оптимизация условий регистрации BRET-сигнала и условий анализа модельных соединений (в качестве последнего использованся прогестерон) позволила внести большой вклад в методологию определения низких концентраций биологически активных веществ, что имеет первостепенную важность как в лабораторных исследованиях, так и в медицине.

Таким образом, данная работа имеет очень высокую практическую пользу и методологическое значение, и ее результаты могут быть использованы в целом ряде дальнейших исследований многих лабораторий.

К сожалению, объем автореферата не позволяет остановиться на некоторых подробностях. Хотя большинство методик описано исчерпывающе - тем не менее остались не совсем проясненными два момента. 1) почему в качестве модельного соединения взят прогестерон? Это имело уже заранее нацеленность в медицинскую практику? Существующие методы определения прогестерона уступают разработанному в данной диссертации? По каким параметрам? Или прогестерон в качестве модели был взят случайно?

2) Автор несколько раз упоминает "новую" мутантную форму люциферазы, со сдвигом максимума и с увеличением термостабильности. Но остается неясным, кто "изобрел" именно используемые аминокислотные замены и на каком основании были выбраны именно они? Существовали ли какие-то ли тературные данные, позволяющие рассчитывать на подобный эффект, или все-таки данный мутант получен не впервые диссертантом? Тогда его не следовало бы называть "новым".

Однако, невзирая на эти вопросы, обусловленные по всей вероятности вынужденной краткостью изложения, данная работа безусловно представляет собой неординарное исследование, имеющее как фундаментальное, так и, в очень большой степени, практическое (методологическое) значение, позволяющее внести новые элементы в разработку методов определения низких количеств биологически-активных соединений, что особенно важно для современной медицины.

Результаты работы грамотно представлены, обсуждены, и не вызывают сомнений. Исследование актуально, выполнено на высоком экспериментальном уровне и, стоит повторить, имеет очень высокую практическую значимость.

Следует заключить, что, судя по автореферату, диссертационная работа "Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и их биологическое применение" является оригинальным исследованием и полностью соответствует требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, и ее автор Д.В.Смирнова заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - биохимия, 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярных основ действия
физиологически активных соединений
ФГБУН Института молекулярной биологии
им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук,

д.х.н.

 Туницкая В.Л.

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д.32
т (499)1350590, e-mail: Ve_tun@mail.ru

