

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Кост Любови Александровны «Разработка индикатора мембранного потенциала на основе красного флуоресцентного белка FusionRed», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология

Актуальность исследования

Диссертационная работа Кост Л.А. посвящена разработке генетически кодируемого индикатора мембранного потенциала (ГКИМП) на основе флуоресцентных белков для визуализации электрической активности живых клеток и тканей. Визуализация электрической активности на основе флуоресцентной микроскопии является одним из наиболее перспективных подходов клеточной нейрофизиологии, благодаря низкой инвазивности, высокой пространственной и временной способности метода, возможности многопараметрического мечения за счет использования различных спектральных вариантов флуоресцентных белков. Также примечательна высокая специфичность мечения: введение на уровне гена данных меток производится под контролем специфических промотеров, позволяющих экспрессировать ГКИМП в выбранном типе клеток, клеточной популяции или даже в отдельных субклеточных компартментах. ГКИМП применяются для визуализации единичных потенциалов действия и подпороговой активности нейронов. Однако оптимального молекулярного инструмента такого типа до сих пор не разработано, как для исследований *in vitro*, так и *in vivo*. что подтверждает безусловную актуальность разносторонних исследований в данном направлении, показательным примером которых служит диссертационное исследование Любови Александровны Кост.

Структура и объем диссертации

Диссертация Кост Л.А. построена по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы. Диссертация изложена на 101 странице, содержит 33 рисунка и 8 таблиц. Список цитируемой литературы включает 122 ссылки. Материал диссертации изложен последовательно, результаты каждого раздела работы взаимно дополняют друг друга. Диссертационная работа носит полноценный и заверченный характер как с точки зрения оформления, так и в вопросе научной целостности. Что, впрочем, не исключает возможность продолжения работы в нескольких направлениях. В

автореферате приведена информация об апробации работы на всероссийских и международных конференциях, а также список из 4 статей по теме работы, опубликованных в рецензируемых журналах.

Обзор литературы

Обзор публикаций по теме работы достаточно представительен, охватывает период от первых работ по электрофизиологии клеток до современных исследований с применением разнообразных электрофизиологических и оптогенетических методов и содержит значительную долю свежих публикаций. Приятной особенностью Обзора литературы является то, что анализ данных сопровождается практическими рекомендациями, которые не только полезны тем, кто не настолько глубоко погружен в тему, как автор диссертации, но и показывает глубокое понимание проблемы Л.А. Кост. Нельзя не отметить традиционный для ИБХ им. Шемякина и Овчинникова подход к анализу собственных и литературных данных, характеризующийся тем, что понимание функций изучаемого объекта всегда базируется на знании его структуры.

В целом эту главу можно рекомендовать для самостоятельной публикации в виде обзора в научном журнале, в тематическом сборнике или в виде лекций студентам Университетов, имеющих биохимические и биофизические кафедры.

Материалы и Методы

Л.А.Кост использовала очень широкий набор молекулярно-биологических методов получения необходимых генетических конструктов, экспрессии целевых белков в клетках, физико-химических методов анализа их спектральных свойств и проявления этих свойств в клеточных линиях и в транзитивно трансфицированных первичных культурах нейронов из мозга мыши. Описание методов показывает, что диссертант глубоко разбирается теоретически и умело применяет на практике знание литературы и навыки приобретенные самой и с помощью коллег-электрофизиологов.

Основные результаты работы

В ходе работы получен набор пермутированных и бимолекулярных вариантов мономерного красного флуоресцентного белка (ФБ) FusionRed, данные методы модификации молекул ФБ производятся для уменьшения стабильности молекулы ФБ. Создание химерных белковых молекул на основе модифицированных таким образом ФБ позволяет получить более чувствительные к конформационным подвижкам конструкции. То есть результирующая химерная белковая молекула молекулярного индикатора с

большой чувствительностью реагирует на изменения регистрируемых параметров. Полученные наработки не только помогли разработать индикатор мембранного потенциала VSD-FR189-188, но и позволяют применять модифицированные ФБ для создания широкого круга химерных молекул на основе ФБ.

Созданный ГКИМП VSD-FR189-188 реализует ранее не использованный для разработки индикаторов данного типа вариант молекулярной архитектуры “insertion into cFP”, что обогащает спектр вариантов для создания индикаторов.

В процессе оптимизации междоменного полипептидного линкера индикатора VSD-FR189-188 получено увеличение кинетических характеристик индикатора (более чем в 25 раз), а также обнаружен феномен смены полярности флуоресцентного ответа индикатора. Данный феномен представляет научный интерес для обширного круга исследователей, работающих над задачей создания химерных конструкций на основе ФБ и молекулярных индикаторов в частности. Задача поиска оптимального сочетания доменов при создании индикатора так же важна, как и понимание фундаментального механизма этого явления.

В работе Кост Л.А. впервые был применен в качестве потенциал-чувствительного домена белок слухового анализатора престин, характеризующийся свойством электроподвижности. Разработка индикатора, обладающего субмиллисекундной кинетикой флуоресцентного ответа и построенного на основе нового потенциал-чувствительного домена, представляет собой значительный вклад в развитие области.

Таким образом, проделанная работа и сформулированные выводы имеют как теоретическую, так и практическую значимость. Полученные результаты, главный из которых – это создание сенсора с динамическим диапазоном $1.23\% \Delta F/F$ на 100 мВ, нельзя считать прорывными, но они, безусловно являются необходимым шагом на пути к созданию принципиально улучшенного ГКИМП как для исследования клеток в культуре, так и для экспериментов *in vivo*.

Достоверность и обоснованность сделанных выводов

Проделан внушительный объем работы, исследование проведено на высоком методологическом уровне. Надежность и достоверность полученных результатов обеспечивается квалифицированным применением современных

молекулярно-биологических, электрофизиологических и спектроскопических и флуоресцентно-микроскопических методов исследования. Выводы диссертации основаны на полученных результатах и корректно сформулированы, содержание автореферата полностью отражает основные результаты и выводы диссертации.

Замечания

1. Стр.4. Глава **Введение**: «Разумно предположить, что яркий индикатор, сигнал которого регистрируется в одном спектральном канале, является наиболее предпочтительным решением для большинства экспериментальных задач».

С этой предпосылкой трудно согласиться, поскольку опыт показывает, что предпочтительным решением являются двухволновые сенсоры, поскольку позволяют в большей степени компенсировать эффекты светорассеяния, выхода из фокуса или другого нежелательного перемещения объекта, фотоиндуцированного разрушения самого сенсора, нестабильности источника возбуждающего света и системы регистрации. Недостатком 2-волновых систем по сравнению с «регистрирующими в одном спектральном канале» является только их большая стоимость. Необходимо, однако отметить, что Любовь Александровна сама в Обзоре литературы корректирует эту спорную точку зрения на преимущества и недостатки одно- и двухволновых индикаторов мембранного потенциала.

2. Глава «Материалы и методы» была бы еще более полезной для читателя, использующего транзиторную трансфекцию, если бы автор указала какие концентрации плазмиды были использованы, какова была длительность инкубации плазмиды с клетками НЕК293, РС-12 и, особенно, с клетками из мозга мыши, о трансфекции которых в Методах не сказано ничего. В последнем случае это особенно важно, т.к. нейроны относятся к терминально дифференцированным клеткам и экспрессируют чужеродные белки в очень небольшом проценте клеток.

3. На Рис. 11 показаны изображения культуры клеток линий НЕК293, однако в тексте диссертации не приведены аналогичные изображения для РС12 и не отмечено по какой причине, хотя Любовь Александровна сама упоминает, что клетки феохромоцитомы можно дифференцировать по нейрональному пути, что в контексте данной работы является их безусловным преимуществом по сравнению с НЕК293.

4. Стр.17. «**Положительное соотношение dF/dV** , т.е. увеличение интенсивности флуоресценции индикатора в ответ на деполяризацию мембраны.»

Выражение dF/dV является математическим символом операции в дифференциальном исчислении, который обозначает бесконечно малое приращение функции в ответ на бесконечно малое приращение аргумента. В реальной экспериментальной работе бесконечно малые изменения не поддаются измерению и необходимо использовать реально задаваемые значения и реально измеримые величины. В данном примере вместо dF/dV должно быть $\Delta F/\Delta V$.

5. Стр.26 «... эквивалентный сайт окружен положительно заряженными остатками – так называемые координирующие остатки (Q97, F101, F137, S398 и R399).»

Среди перечисленных аминокислотных остатков положительно заряд боковой цепи только у Arg399. Остальные электронейтральны, а остатки фенилаланина даже гидрофобны.

6. Рис. 27. Из контекста понятно, что изображения клеток культуры мозга имеют иллюстративный характер и показывают возможность экспрессии конструкции Prestin-5, все же необходимо было указать из какой части мозга были получены клетки: из коры, гиппокампа, мозжечка ? Каким образом, на каком количестве клеток и посадок культуры подсчитывали эффективность трансфекции. Это важный вопрос потому, что главной мишенью для применения любых ГКИМП являются, прежде всего, электровозбудимые клетки, в первую очередь, нейроны *in vitro* и *in vivo*.

Считаю необходимым подчеркнуть, что упомянутые замечания носят чисто технический характер, являются скорее советами по улучшению, чем констатацией серьезных ошибок и не влияют на научную ценность диссертационной работы. В целом же, диссертационная работа Кост Л.А. представляет собой полноценное, грамотно спланированное и проведенное научное исследование, на актуальную тему, имеющую как практическое, так и фундаментально-научное значение.

Заключение

Актуальность и новизна полученных результатов, высокий методологический уровень работы и ее теоретическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Кост Любови Александровны “Разработка индикатора мембранного потенциала на основе

красного флуоресцентного белка FusionRed" представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 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 сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент

Главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии»

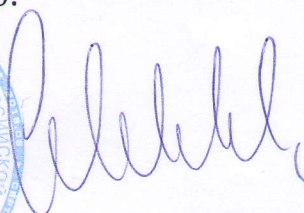
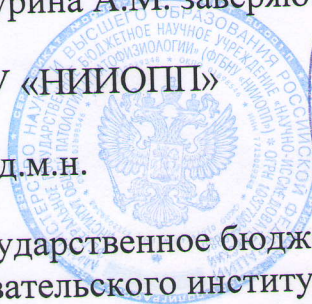


Сурин Александр Михайлович

Подпись д.б.н. Сурина А.М. заверяю:

Директор ФГБНУ «НИИОПП»

член-корр. РАН, д.м.н.



Морозов С.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии
Москва, Балтийская ул., д.8
125315 Российская Федерация
Тел: 8(916)498-9413
E-mail: surin_am@mail.ru

« 21 » февр. 2022г.